

ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA

**ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DO MELANOMA CUTÂNEO
PRIMÁRIO E METASTÁTICO.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.**

SÃO PAULO

2007

ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA

**ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DO MELANOMA CUTÂNEO
PRIMÁRIO E METASTÁTICO**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos

**CO-ORIENTADORES: Dr. Heitor Francisco de Carvalho Gomes
Dr. Airton Abrahão Martin**

SÃO PAULO

2007

Oliveira, Andrea Fernandes.

Espectroscopia FT-Raman no Diagnóstico Diferencial do Melanoma Cutâneo Primário e Metastático./ Andrea Fernandes de Oliveira – São Paulo, 2007.
xiv, 66f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica.

FT-Raman Spectroscopy in Primary and Metastatic Cutaneous Melanoma Diferencial Diagnosis.

1.Análise Espectral Raman 2.Melanoma 3.Diagnóstico Diferencial

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA

COORDENADORA: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, exemplo de força e dedicação.

Ao meu esposo, ao meu lado em todas as horas.

Ao meu irmão, por seu amor e carinho.

Aos meus sogros e cunhadas, pelo apoio e compreensão.

**Aos pacientes, objetivo da nossa árdua caminhada para
realização de pesquisa no nosso país.**

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira**, Professora Titular Livre-Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo. Incentivadora incansável do crescimento da pesquisa no Brasil. Líder de extraordinária capacidade administrativa e visão científica que nos últimos anos elevou a Pós-Graduação da Disciplina de Cirurgia Plástica para um nível de excelência.

Ao **Prof. Dr. Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos**, Professor Chefe Livre-Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia, responsável pelo setor de Tumores Cutâneos da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo. Exemplo de professor, profissional e pessoa, dedicado ao estudo do melanoma cutâneo, mas ao mesmo tempo, dedicado aos seus pupilos, pacientes e família. Pelos importantíssimos ensinamentos técnicos e de ética na vida profissional, acadêmica e pessoal, desde a minha residência. Pelo apoio e carinho, sempre disponível e presente.

Ao Dr. **Heitor Francisco de Carvalho Gomes**, Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, colaborador do setor de Tumores Cutâneos da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pela amizade, apoio e sugestões dedicadas a este trabalho.

Ao Dr. **Airton Abrahão Martin**, Professor Assistente da Universidade do Vale do Paraíba de Engenharia Biomédica, Coordenador do Grupo de Espectroscopia Vibracional Biomédica, por possibilitar a integração necessária e pela sugestões inestimáveis para realização desse estudo.

Ao Dr. **Herculano da Silva Martinho**, Professor Afiliado da Universidade do Vale do Paraíba, Colaborador do Grupo de Espectroscopia Vibracional Biomédica, pelas informações e sugestões dedicadas ao estudo.

À Dra **Mílvia Maria Simões e Silva Enokihara**, Doutora pela Universidade Federal de São Paulo, Médica Patologista do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, pelo apoio e conhecimentos generosamente compartilhados para realização deste trabalho.

À pós-graduanda **Renata Bittar**, Mestre pela Universidade do Vale do Paraíba, por sua amizade e generosidade ao compartilhar generosamente seu tempo e sua experiência sobre o tema.

Aos **Pós-Graduandos** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelo incentivo e amizade.

Aos residente e ex-residentes da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, **Carlos Koji Ishizuka, Marcelo Avelar, Rafael Santos, Erica Mansano, Danielle Battistoni, Ana Carolina Degan, Gilberto Bizutti, Marcello Di Martino, Matthias Weinstock, Rafael Santos, Rodrigo Costa Aloe, Carolina Paiva, Gustavo Feriani, Luis Eduardo Barbosa, Mario Guilherme Rocha, Thiago Biasi, Yong Jin Kim, Ana Paula Ferreira, Flaviane Vilas Boas, Guilherme Brito, Juliana Furia, Leandro Dutra, Renato Fusaro Neto, Fernanda Fontanezi, Flaviane Villas-Boas, Ludmila Kobayashi, Marcello Simão, Rafael Arruda, Rafael Alves Chu, Vanessa Resende** pelo apoio e pela amizade durante todo o percurso na concepção e realização desta tese.

Às secretárias: **Sandra da Silva, Silvana Aparecida Costa de Assis e Marta Rejane dos Reis Silva**, pela inestimável participação direta e indireta no desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade Federal de São Paulo (Disciplina de Cirurgia Plástica)**, por me acolher e me aprimorar na especialidade escolhida para minha carreira médica.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, onde iniciei essa caminhada.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTAS.....	ix
RESUMO.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. LITERATURA.....	5
4. MÉTODOS.....	14
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS.....	34
NORMAS ADOTADAS.....	38
SUMMARY.....	39
APÊNDICE.....	40
ANEXO.....	57

LISTAS

Listas de Figuras

Figura 1. Peça anatômica contendo lesão nodular primária de melanoma cutâneo, retirada de fragmento da periferia da lesão e tubo identificado para armazenamento da amostra.....	16
Figura 2. Material utilizado para dividir as amostras e o porta-amostra.....	17
Figura 3. Porta-amostra com amostra sendo ajustada no seu interior.....	17
Figura 4. Porta-amostra em detalhe.....	18
Figura 5. Posicionamento dos pontos na amostra.....	19
Figura 6. Espectrômetro FT-Raman RFS 100 da Bruker [®]	20
Figura 7. Compartimento de amostra com porta-amostra posicionado.....	20
Figura 8. Espectros do grupo controle (pele normal).....	24
Figura 9. Espectros do grupo melanoma primário.....	25
Figura 10. Espectros do grupo metástase de melanoma.....	25
Figura 11. Mediana dos espectros Raman de melanoma primário e melanoma metastático...26	
Figura 12. Diferenciação dos grupos através das duas funções discriminantes obtidas.....27	
Figura 13. Espectro da primeira unidade amostral do grupo melanoma primário.....41	
Figura 14. Espectro da segunda unidade amostral do grupo melanoma primário.....41	
Figura 15. Espectro da terceira unidade amostral do grupo melanoma primário.....42	
Figura 16. Espectro da quarta unidade amostral do grupo melanoma primário.....42	
Figura 17. Espectro da quinta unidade amostral do grupo melanoma primário.....43	
Figura 18. Espectro da sexta unidade amostral do grupo melanoma primário.....43	
Figura 19. Espectro da sétima unidade amostral do grupo melanoma primário.....44	

Figura 20. Espectro da oitava unidade amostral do grupo melanoma primário.....	44
Figura 21. Espectro da nona unidade amostral do grupo melanoma primário.....	45
Figura 22. Espectro da décima unidade amostral do grupo melanoma primário.....	45
Figura 23. Espectro da primeira unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	46
Figura 24. Espectro da segunda unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	46
Figura 25. Espectro da terceira unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	47
Figura 26. Espectro da quarta unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	47
Figura 27. Espectro da quinta unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	48
Figura 28. Espectro da sexta unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	48
Figura 29. Espectro da sétima unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	49
Figura 30. Espectro da oitava unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	49
Figura 31. Espectro da nona unidade amostral do grupo melanoma metastático.....	50
Figura 32. Distribuição da variável Fenilalanina em cada grupo estudado.....	52
Figura 33. Distribuição da variável DNA em cada grupo estudado.....	52
Figura 34. Distribuição da variável Amida I em cada grupo estudado.....	53
Figura 35. Distribuição da variável Aminoácidos, Valina e Prolina em cada grupo estudado.....	53
Figura 36. Distribuição da variável Adenina e Fenilalanina em cada grupo estudado.....	54
Figura 37. Distribuição da variável Lipídios, Proteínas, Amido III em cada grupo estudado.....	54
Figura 38. Distribuição da variável PO^{2-} , Ácidos nucléicos em cada grupo estudado.....	55
Figura 39. Distribuição da variável Polissacarídeos em cada grupo estudado.....	55
Figura 40. Distribuição da variável Proteínas e Lipídios em cada grupo estudado.....	56
Figura 41. Distribuição da variável Tirosina em cada grupo estudado.....	56

Figura 42. Descrição esquemática do Efeito Raman. $h\nu_i$: energia da luz incidente; $h\nu_R$: energia da luz espalhada.....64

Figura 43. Sistema de espectroscopia FT-Raman.....66

Lista de Quadros

Quadro 1. Modos Vibracionais e Biomoléculas relacionadas aos espectros de Pele Normal, Nevo Pigmentado e Melanoma Primário (Modificado de Gniadecka, 1997).....	4
---	---

Lista de tabelas

Tabela 1. Medidas descritivas das variáveis estudadas, em cada grupo.....	51
Tabela 2. Medidas descritivas das variáveis estudadas, em cada grupo.....	51

Lista de abreviaturas e símbolos

cm - centímetros

cm^{-1} – unidade de energia

C - carbono

DNA – ácido desoxirribonucleico

FT-Raman – espectroscopia Raman com Transformada de Fourier

H – hidrogênio

IR – infra-vermelho

ml - mililitros

mm - milímetros

mW- miliwatts

N - nitrogênio

Nd:YAG – *laser* Neodímio Ítrio-Alumínio-Granada

nm – nanômetros

O - oxigênio

Ti:Safira – *laser* Titânio Safira

UV - ultravioleta

μm - micrômetros

RESUMO

Introdução: O prognóstico do paciente com melanoma cutâneo está associado ao diagnóstico precoce seguido de excisão correta da lesão, tornando essencial sua detecção em estágio inicial. A espectroscopia Raman é uma técnica óptica que fornece informações sobre as vibrações moleculares de uma amostra. Essa técnica utiliza a luz *laser* que pode ser conduzida por fibras ópticas, como instrumento para investigação não destrutível de tecidos biológicos possibilitando uma análise não invasiva da lesão, em tempo real. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi qualificar os dados espectrais FT-Raman de melanoma cutâneo primário e metastático, visando o diagnóstico diferencial. **Métodos:** Foram utilizadas amostras de 10 fragmentos de pele sem alterações clínicas e histopatológicas, 10 de melanomas cutâneos e 9 de metástases linfonodais. Após o procedimento cirúrgico, as amostras foram identificadas e armazenadas individualmente em tubos e conservadas em nitrogênio líquido. As amostras foram descongeladas em solução fisiológica a 0,9 %. Cada amostra foi dividida em 2 ou 3 frações de 2 mm³ e colocada no porta-amostra e posicionados para obtenção do espectro Raman, fazendo-se a luz monocromática do laser de Nd:YAG de 1064 nm incidir sobre a amostra. Eletronicamente, com auxílio do OPUS[®] foram variados cinco pontos de coleta por amostra FT-Raman, em uma distância de 250 μm. O registro total de coleta foi realizado em um período de tempo menor que 10 minutos. A luz espalhada das amostras chega ao detetor, que converte a intensidade da luz em sinais elétricos, que são interpretados no computador na forma de espectro Raman. **Resultados:** A análise visual dos espectros mostraram diferenças entre os grupos estudados, principalmente nas bandas e picos do espectro Raman correspondentes a proteínas. Para diferenciar os três grupos formados de acordo com as características extraídas dos espectros, realizou-se uma análise discriminante dos dados. As variáveis Fenilalanina, DNA e Amido-I destacaram-se na diferenciação dos três grupos. A porcentagem de indivíduos corretamente classificados com este critério foi de 93,1%; o que mostra a eficiência da análise realizada. **Conclusão:** A espectroscopia FT-Raman é capaz de diferenciar o melanoma de sua metástase, assim como da pele normal.

1-INTRODUÇÃO

A incidência do melanoma cutâneo vem aumentando a níveis mais elevados do que em outras neoplasias no homem e é responsável por seis de cada sete mortes causadas por câncer de pele (LANG, 1998). As taxas de mortalidade também aumentaram, mas em proporção inferior à incidência, devido a campanhas de prevenção e diagnóstico mais precoce, uma vez que não ocorreram grandes mudanças no tratamento desse tumor (MARKS, 2000).

Estas duas tendências, aumento da incidência e simultaneamente diminuição na mortalidade do melanoma cutâneo, pode parecer contraditória; entretanto, existe uma explicação racional para isso. Em cerca de 90% dos casos, o melanoma é diagnosticado no estágio de tumor primário. A incidência de melanoma espesso, com um prognóstico desfavorável, tem permanecido quase constante desde 1980, enquanto a incidência do melanoma fino, com um prognóstico mais favorável, vem aumentando dramaticamente. Então o nível de mortalidade permanece relativamente constante enquanto a incidência continua a aumentar (GARBE & EIGENTLER, 2007).

A possibilidade de cura no melanoma cutâneo está associada ao diagnóstico precoce seguido de excisão da lesão, tornando essencial sua detecção em estágio inicial. A remoção de todas as lesões pigmentadas suspeitas é inaceitável, principalmente quando o paciente apresenta múltiplas lesões em locais esteticamente importantes como a face. Estudos prévios demonstraram que análise e exérese de lesões suspeitas indicadas por médicos não especializados resultaram em 80% de lesões benignas, assim a retirada da lesão foi desnecessária (MORTON & MACKIE, 1998).

O desenvolvimento de métodos para diminuir a morbidade vem sendo perseguido e surgiram técnicas como a dermatoscopia para auxiliar na indicação das biópsias. A dermatoscopia aumenta a acurácia do diagnóstico do melanoma em aproximadamente 90%, porém é método subjetivo, está associada à experiência do examinador e seu treinamento com os critérios dermatoscópicos estabelecidos na literatura (MENZIES, 2006).

Atualmente, o exame histopatológico continua sendo “padrão ouro” no diagnóstico do melanoma, mas está sedimentado na morfologia dos tecidos e na interpretação e experiência do examinador, tornando seus resultados subjetivos. Outro fator discutido na literatura é a falta de uniformidade na maneira de aplicar os critérios diagnósticos, causando dúvidas no momento de realizar diagnóstico diferencial entre lesões melanocíticas, principalmente quando as lesões são incipientes e microscopicamente semelhantes (VERONESE & MARQUES, 2004). Um diagnóstico objetivo, com menor morbidade e de fácil manuseio é necessário para otimizar a detecção precoce do melanoma.

A espectroscopia Raman é a técnica óptica que fornece informações sobre as vibrações moleculares de uma amostra. Recentemente, emergiu como instrumento para investigação não destrutível de tecidos biológicos (BITAR et al., 2006). Essa técnica utiliza a luz “*laser*” que pode ser conduzida por fibras ópticas, possibilitando uma análise não invasiva da lesão, sem a remoção de tecidos ou células, preparo prévio também não se faz necessário e o resultado é obtido em tempo real (PEREIRA et al., 2004).

A espectroscopia Raman possui diversas vantagens e grandes perspectivas para o diagnóstico de todos os tipos de neoplasias. Ela investiga os constituintes moleculares e estruturais das amostras e permite detectar modificações na bioquímica celular que ocorrem na presença de doenças. Essas alterações podem auxiliar na detecção precoce de lesões neoplásicas, na realização de diagnósticos de

múltiplas lesões, no rastreamento de lesões incipientes não manifestadas clinicamente, na determinação de margens de segurança durante ressecção das lesões, com base no conceito de que as alterações bioquímicas antecedem as morfológicas (SCHUT, 2002).

2 - OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi qualificar os dados espectrais FT- Raman de melanoma cutâneo primário e metastático, visando o diagnóstico diferencial.

3- LITERATURA

3.1 - Diagnóstico clínico do melanoma cutâneo

PICCOLLO et al (2002) citam outro campo de progresso no diagnóstico precoce do melanoma foi o desenvolvimento da dermatoscopia computadorizada, com a criação de diversas novas possibilidades para o diagnóstico precoce do melanoma. Em pessoas de risco elevado, mudanças no aspecto das lesões pigmentadas podem ser identificadas nos exames de seguimento através das fotos armazenadas no computador, quando comparado com imagem atual da lesão suspeita. Isto abre uma nova dimensão na sensibilidade diagnóstica; da mesma forma, figuras macroscópicas das lesões armazenadas podem ser usadas para identificar desenvolvimento de novas lesões. Outro fator importante no desenvolvimento da dermatoscopia digital é a análise digital da imagem, através de programas de computadores desenvolvidos para essa finalidade e que podem fornecer um diagnóstico automático do melanoma.

THOMPSON et al (2005) numa revisão sobre melanoma cutâneo abordaram as dificuldades do diagnóstico clínico. A maioria dos melanomas podem ser identificados clinicamente através de exame cuidadoso com iluminação adequada e magnificação. Uma suspeita clínica deveria surgir por alguma mudança significativa em um nevo ou lesão cutânea existente, porém alguns melanomas não apresentam essas características clássicas. A Organização Mundial de Saúde recomenda biópsia excisional como técnica de escolha para diagnóstico de lesões pigmentadas suspeitas. Para suspeita de melanoma, uma biópsia excisional com margem de 1-2 mm incluindo tecido subcutâneo é padrão para remover a lesão inteira para um bom exame anatomopatológico. A biópsia incisional é aceita para estabelecer o diagnóstico de

lesões que são extensas ou localizadas em áreas esteticamente sensíveis, sem a necessidade de remover o espécime inteiro.

MENZIES (2006) descreve os progressos significantes no diagnóstico precoce do melanoma com o desenvolvimento da dermatoscopia, método para visualização das estruturas localizadas abaixo do estrato córneo. A dermatoscopia é uma técnica simples que utiliza aumento de imagem (mais comum é o aumento de 10 vezes) associada ao uso de luz e líquido entre a pele e o aparelho. Esse líquido (óleo, água, gel ou glicerina) elimina a reflexão da luz, permitindo sua penetração e visualização das características resultantes, principalmente a presença do pigmento melânico nas diferentes camadas da pele. As características do melanoma cutâneo podem ser detectadas mais facilmente pela microscopia de epiluminescência e a imagem obtida é interpretada utilizando-se método diagnóstico de preferência do examinador. O mínimo necessário para dermatologista realizar o exame físico das lesões cutâneas pigmentadas é o uso do dermatoscópio. Em mãos experientes essa técnica mostrou aumento da especificidade e sensibilidade no diagnóstico do melanoma. Em pacientes com alto risco para o desenvolvimento de melanoma deve-se realizar também o mapeamento de corpo inteiro através de fotos, com intenção de detectar surgimento de novas lesões ou mudanças nas lesões suspeitas. Muitos melanomas são clinicamente detectados somente quando apresentam mudanças visíveis. A dermatoscopia tenta detectar essas mudanças quando ainda são iniciais.

MARKOVIC (2007) cita que o diagnóstico definitivo do melanoma depende da biópsia. Ao lado da confirmação diagnóstica, a biópsia é importante no planejamento do tratamento do melanoma. O fator prognóstico mais importante no melanoma primário é a espessura de Breslow, que é um indicador de tempo de sobrevida. O tipo de biópsia empregado depende do tamanho da lesão, da sua localização e do resultado estético esperado. Excisão cirúrgica permanece o principal tratamento do melanoma. A detecção precoce, enquanto a lesão ainda é fina

(<0,76mm), e a excisão apropriada oferece a melhor chance de controle para o paciente.

3.2 - Diagnóstico anatomopatológico do melanoma cutâneo

SLATER (2000) cita que o diagnóstico das lesões melanocíticas possui uma reputação de apresentar uma reprodutibilidade pobre e uma grande variação entre examinadores diferentes. O exame histopatológico dessas lesões é complicado devido a um número significativo de lesões que podem mimetizar o melanoma. Critérios variados para diagnosticar o melanoma são geralmente difíceis de serem seguidos. Existem também características próprias do melanoma que dificultam seu diagnóstico, como a presença de regressão que pode remover evidências histológicas da lesão, melanomas primários que podem surgir da derme ou lesões metastáticas que podem ser puramente epidermotrópicas. O uso de marcadores moleculares (HMB-45, Melan-A) diminui essa dificuldade diagnóstica, mas pode apresentar falhas porque esses anticorpos também são encontrados em lesões benignas. Assim, os patologistas devem ser encorajados a solicitar segunda e terceira opiniões quando existem dúvidas. Este processo é de grande valor para eliminar diagnósticos incorretos.

RIKER et al (2005) descrevem a dificuldade do diagnóstico clínico e anatomopatológico das lesões melanocíticas. Não existe uma aparência “clássica” para o melanoma. Entretanto, o exame histopatológico ainda é o padrão ouro para o diagnóstico exato do melanoma nos dias atuais. O prognóstico e também o tratamento dependerão não somente do diagnóstico patológico, mas também das medidas e parâmetros do exame histopatológico. Esses parâmetros incluem espessura

tumoral, presença de ulceração, nível de Clark, número de mitoses, e também medida microscópica das margens de segurança. A descrição do exame histopatológico serve como microestadiamento do tumor e, na ausência de doença metastática detectável clinicamente, fornece a melhor avaliação e informação sobre o prognóstico do paciente.

3.3 - Biópsia óptica

GNIADÉCKA et al (1997) destacam a biópsia óptica utilizando a espectroscopia Raman, apresentando suas vantagens como a ausência de risco de contaminação ao paciente e ao profissional da saúde, por ser um método não invasivo, que dispensa retirada de tecido do paciente para sua análise e usa fibras óticas, cateteres, cânulas e endoscópios. É um método de análise não destrutiva, não decompõe a amostra de forma mecânica, química, fotoquímica ou térmica; determina a estrutura e a conformação de componentes molecular, não requerendo preparação prévia da amostra e o resultado é obtido em tempo real.

HANLON et al (2000) destacam os avanços significativos que ocorreram na última década na tecnologia de cada componente de sistemas laboratoriais Raman, o que tornou essa técnica uma potente ferramenta para determinar a composição bioquímica do tecido humano.

PEREIRA et al (2004) cita a importância de estudos realizados na busca do desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas que sejam menos invasivas e forneçam resultados em tempo real, eliminando assim, as principais desvantagens encontradas na técnica da biópsia convencional. Dentre as técnicas estudadas destaca-se a biópsia óptica, técnica que utiliza a espectroscopia óptica

(espectroscopia Raman, espectroscopia de Fluorescência e espectroscopia no Infravermelho) no diagnóstico e estudo sobre doenças.

3.4 - Espectroscopia Raman no estudo da pele

EDWARDS et al (1995) foram os primeiros pesquisadores a utilizarem a espectroscopia FT-Raman com ferramenta diagnóstica nas lesões de pele benignas. Eles estudaram o diagnóstico diferencial entre pele normal e lesões hiperqueratóticas da pele, como psoríase e queratose seborreica. A principal diferença foi atribuída à menor quantidade de lipídios do estrato córneo nas lesões hiperqueratóticas.

LAWSON et al (1997) escreveram uma revisão sobre as aplicações da espectroscopia Raman na medicina. Estudos biomédicos usando espectroscopia Raman somente se tornaram bem estabelecidos com a introdução da transformada de Fourier em meados de 1980. Este avanço na tecnologia marcou o início da melhoria nos estudos dos tecidos que tinham sido previamente impedidos pela fluorescência. No estudo da pele, a espectroscopia Raman foi utilizada inicialmente para observar modificações após uso de fármacos tópicos, devido dificuldade no uso de animais experimentais com estrato córneo semelhante ao humano. Esses estudos se tornaram viáveis após comprovação de mudanças pouco significativas na intensidade dos espectros Raman coletados de pele *in vivo* e *ex vivo*.

GNIADHECKA et al (1997) estudaram a diferença da estrutura proteica e da água entre pele proveniente de biópsias de pacientes jovens (entre 22 e 29 anos) e idosos (entre 74 e 87 anos). A espectroscopia Raman conseguiu demonstrar

diferença significativa entre os grupos, principalmente na banda correspondente a proteína amida I.

KNUDSEN et al (2002) estudaram a variação da pigmentação da pele através da espectroscopia Raman e se essa quantidade de pigmento poderia influenciar na interpretação dos espectros. Para obter uma variação significativa da pigmentação da pele, os autores utilizaram áreas da pele que usualmente estão expostas ao sol e áreas não expostas no mesmo paciente. Foi realizada uma comparação entre essas áreas de pele do mesmo paciente e entre as diferentes pessoas estudadas. Os espectros Raman obtidos de pele humana contêm bandas bem definidas que são características de proteínas, lipídios e água. Somente as bandas dominantes que caracterizam proteína e água foram avaliadas no estudo. Os espectros obtidos “*in vivo*” mostraram pequenas variações entre si, exceto em relação à amplitude das ondas, parcialmente causada pela diferença de pigmentação das amostras estudadas. Também foram observadas variações na banda amida III entre os pacientes, provavelmente causadas por diferenças na estrutura ou quantidade de colágeno.

3.5 - Espectroscopia Raman no estudo de neoplasias da pele

GNIADCKA et al (1997) demonstraram diagnóstico diferencial entre pele normal e pele contendo carcinoma basocelular com auxílio de sistemas neurais. Sistema neural é um programa de computador, que imita uma rede de células neurais, esse programa pode ser treinado para capturar pequenas mudanças nos espectros. Através desse método os autores evidenciaram que as principais mudanças se encontravam na estrutura molecular dos lipídios e das proteínas.

NIJSSEN et al (2002) exploraram a aplicabilidade da espectroscopia Raman em distinguir o carcinoma basocelular do tecido não neoplásico ao redor da lesão, foram estudadas 15 amostras congeladas provenientes de biópsias, após coleta dos espectros da lesão tumoral e do tecido adjacente, as amostras foram fixadas em formol e enviadas para estudo anatomopatológico. Este estudo *in vitro* foi capaz de diferenciar o tecido neoplásico do tecido normal, a técnica ainda necessita de tecnologia avançada que permita o uso na prática médica, mas pode futuramente tornar alguns procedimentos mais eficientes, como por exemplo a cirurgia de Mohs.

NUNES et al (2003) demonstrou através da espectroscopia FT-Raman a presença de diferenças espectrais entre fragmentos de pele normal e fragmentos de pele com carcinoma basocelular, com objetivo de realizar um diagnóstico óptico. As diferenças espectrais mais importantes ocorreram entre os modos vibracionais do amida I (1640 a 1680 cm^{-1}), amida III (1220 a 1300 cm^{-1}), aminoácidos (939 a 940 cm^{-1}), ácidos nucleicos (1.070 a 1.085 cm^{-1}) e DNA (1.600 a 1.620 cm^{-1}).

PEREIRA et al (2004) estudaram o diagnóstico diferencial entre pele normal e carcinoma espinocelular e observaram grande diferença entre os espectros nas faixas 1272, 1452 e 1660 cm^{-1} . Através de observações da literatura, sabe-se que as alterações nesses picos dos espectros na pele correspondem a alterações nas estruturas das proteínas.

3.6 - Espectroscopia Raman no estudo de lesões melanocíticas

HUANG et al (2004) obtiveram espectro Raman de melanina de pele humana utilizando espectroscopia próxima ao infravermelho. Os sinais Raman da melanina cutânea “*in vivo*” são similares aos observados na eumelanina natural e sintética. O espectro Raman da melanina é dominado por dois picos intensos e largos em 1580 e 1380 cm^{-1} . A capacidade para adquirir estes sinais sugere que a espectroscopia Raman pode ser um método clínico utilizável para análise e diagnóstico de lesões na pele “*in vivo*”.

GNIADHECKA et al (2004) estudaram o diagnóstico diferencial entre lesões pigmentadas benignas que fazem diagnóstico diferencial com melanoma cutâneo utilizando sistemas neurais. Os autores utilizaram fragmentos de carcinoma basocelular pigmentado (CBC), queratose seborreica e nevo pigmentado; pele normal foi estudada como grupo controle. A espectroscopia Raman mostrou diferenças entre as lesões investigadas. O melanoma apresentou uma diminuição na intensidade da banda amida I, resultando num achatamento da área espectral entre 1500 e 1800 cm^{-1} . Também foi observado um aumento na intensidade da banda 1300 cm^{-1} dos lipídios e na banda 1310 a 1330 cm^{-1} observou-se relativa diminuição na região da amida III. O espectro do CBC mostrou similaridade ao do melanoma na região de 1300 a 1340 cm^{-1} . O melanoma e o CBC também apresentaram uma diminuição no pico 940 cm^{-1} , que corresponde a molécula protéica. Em contraste com o melanoma, o CBC não mostrou diminuição na intensidade da banda amida I. A queratose seborreica mostrou uma diminuição importante na intensidade da banda 1300 cm^{-1} , assim é possível diferenciá-la de um possível CBC. O espectro de nevo pigmentado foi quase idêntico ao de pele normal, exceto na região de 1800 a 2500 cm^{-1} , onde ocorreu um aumento global da intensidade do espectro, provavelmente devido a um aumento da pigmentação. As

semelhanças encontradas no espectro entre CBC e melanoma sugerem que a transformação neoplásica das células seja desencadeada por mecanismos semelhantes. As alterações das bandas amida no espectro Raman foram atribuídas a mudanças na conformação molecular das proteínas. A espectroscopia Raman constatou uma diferença diagnóstica entre as lesões pigmentadas escolhidas para esse estudo.

4 - MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas amostras de 10 fragmentos de pele sem alterações clínicas e histopatológicas, 10 de melanomas cutâneos e 9 de metástases linfonodais obtidas de pacientes atendidos no Hospital São Paulo – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UNIFESP sob o número 01642/05 (anexo 1). As amostras foram provenientes de ressecção de tumores primários ou de linfadenectomia terapêutica. Os pacientes foram informados sobre a pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para uso das amostras (anexo 2). Os pacientes foram selecionados de forma consecutiva e não aleatória.

As amostras de pele sem alterações clínicas e histopatológicas foram provenientes de pequenos procedimentos, onde pequenos fragmentos de pele foram removidos por necessidade clínica (por exemplo: correção de pele excedente em várias partes do corpo, ou elipse de pele envolvendo lesões benignas); esse grupo foi denominado controle.

Os fatores de inclusão dos pacientes foram lesões primárias acima de 2cm, em fase vertical de crescimento, com índice de Breslow acima de 4 mm ou com metástases linfonodais acima de 2cm, que podem apresentar invasão capsular ou linfonodos confluentes. Os fatores de exclusão dos pacientes foram lesões na fase radial de crescimento, menores que 2 cm, ou com linfonodos pequenos (menores que 2 cm). Não houve prejuízo ao diagnóstico porque a casuística foi formada por lesões metastáticas e lesões primárias de grandes dimensões.

Na coleta do material proveniente de lesões primárias, foram selecionados apenas pacientes com lesões nodulares ou ulceradas e com dimensões acima de 2 cm de diâmetro. Lesões consideradas apenas suspeitas, pequenas (menores que 2 cm), ou com componente de crescimento na fase radial ou horizontal, não foram utilizadas, evitando prejuízos na determinação da espessura de Breslow. Os demais casos foram coletados de linfonodos apresentando macrometastases ou invasão capsular.

Durante o ato operatório, um pequeno fragmento medindo 0,5 cm era obtido da porção caudal da peça cirúrgica por meio de incisão no sentido longitudinal, utilizando bisturi lâmina número 15 e pinça anatômica (Figura 1). A coleta do material foi realizada quando a peça já estava fora do paciente para evitar manipulação do sítio da lesão e possível propagação hematogênica. A peça cirúrgica principal foi enviada para exame anatomopatológico de rotina.

Após o procedimento cirúrgico, as amostras de melanoma foram identificadas e armazenadas individualmente em tubos criogênicos de 1,2 ml, e conservadas em nitrogênio líquido (-196°C) no Banco de Tumores Cutâneos da Disciplina de Cirurgia Plástica, para preservação e manutenção de todas as estruturas teciduais do fragmento. Posteriormente, as amostras foram transferidas para o Banco de Dados de Amostras do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), na Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), onde continuaram preservadas, nas mesmas condições, até o momento da aquisição dos espectros FT-Raman.

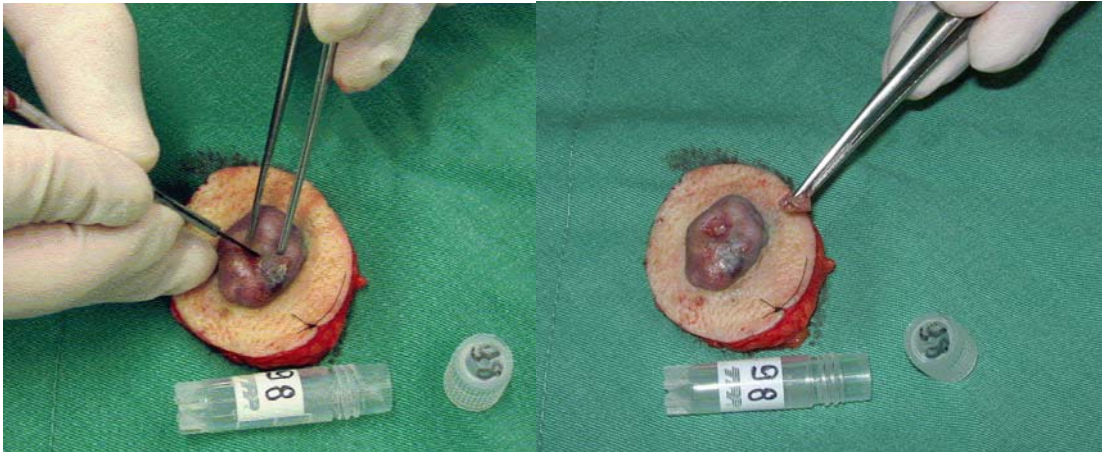


Figura 1 - Peça anatômica contendo lesão nodular primária de melanoma cutâneo, retirada de fragmento da periferia da lesão e tubo identificado para armazenamento da amostra.

4.1- Obtenção dos espectros FT-Raman de Melanoma

Os materiais utilizados para divisão das amostras de melanoma em fragmentos menores para posicionamento no espectrômetro foram: cabo de bisturi, lâmina de bisturi número 15, pinça anatômica, tesoura, placa de vidro, gaze, solução fisiológica, luvas descartáveis, solução formol a 10% e porta-amostra (Figura 2).

Para aquisição dos espectros FT-Raman, as amostras de melanoma cutâneo e metástase foram descongeladas em solução fisiológica a 0,9 %. Cada amostra foi dividida em 2 ou 3 frações de 2 mm^3 , número este variando dependendo do tamanho da amostra original (Figura 3). O número de espectros coletados por fração de amostra foi de 5 pontos para melhor elaboração da análise estatística. O tamanho padronizado para secção das amostras é específico para acomodação das mesmas ao porta-amostra de alumínio desenvolvido exclusivamente para o ajuste dos tecidos biológico na espectroscopia FT-Raman (Figura 4).



Figura 2 – Material Utilizado para dividir as amostras e o porta-amostra

O conjunto amostra e porta-amostra foram posicionados para obtenção do espectro Raman, fazendo-se a luz monocromática do laser de Nd:YAG incidir sobre a amostra. Eletronicamente, com auxílio do OPUS[®] foram variados cinco pontos de coleta por amostra FT-Raman, em uma distância de $250 \mu\text{m}$ (Figura 5). O registro total de coleta foi realizado em um período de tempo menor que 10 minutos.

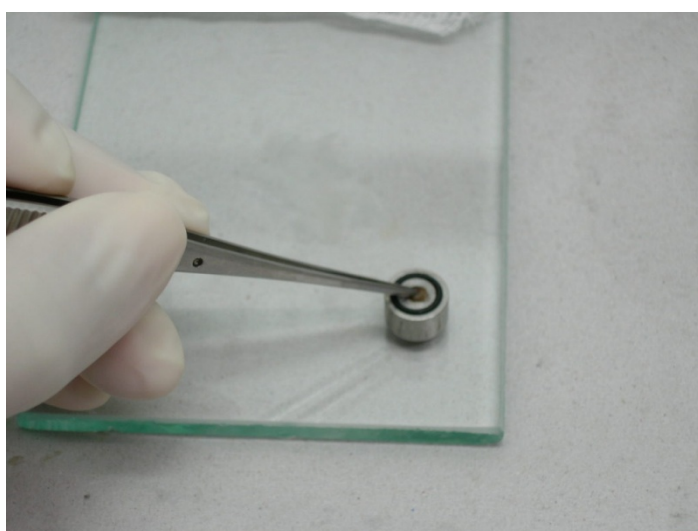


Figura 3 - Porta-amostra com amostra sendo ajustada no seu interior

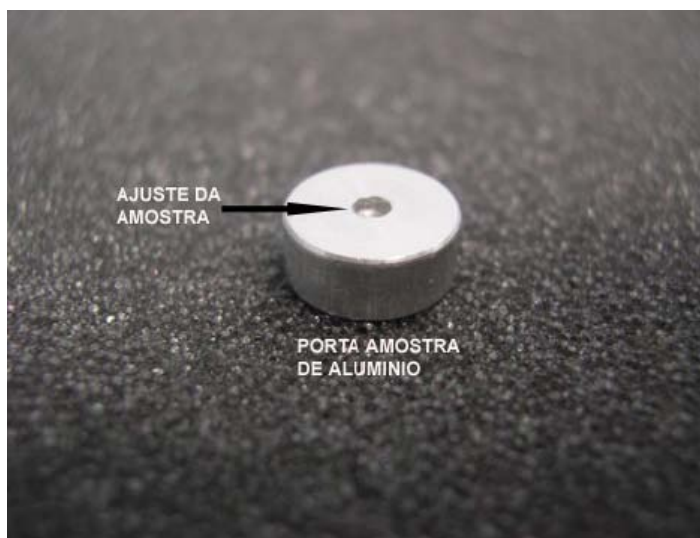


Figura 4 - Porta-amostra em detalhe

O espectrômetro FT-Raman (RFS 100 da Bruker[®]), foi utilizado com o laser Nd:YAG de 1064 nm como fonte de excitação (Figura 6). Os sinais Raman foram coletados por detector de germânio resfriado por nitrogênio líquido, seguindo os seguintes parâmetros de aquisição:

- Geometria de Espalhamento: 180°
- Amostra colocada em porta-amostras de alumínio fechado com lamínula de vidro (Figura 7)
- N° de pontos na amostra: 5 pontos
- Potência de saída do laser de excitação:
 - Melanoma: 100 - 300mW
 - Metástase: 100mW

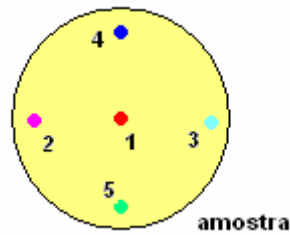


Figura 5 - Posicionamento dos pontos na amostra.

A potência de saída do *laser* teve que ser ajustada para o melanoma e para a metástase devido à intensidade de luminescência emitida por esses tecidos. As amostras pigmentadas emitiram energia que saturou o sistema de detecção do equipamento. Por essa razão, a potência foi reduzida para as amostras de melanoma e metástase, que apresentaram altas intensidades de energia emitida.

- Laser de excitação: modo Focado
- N° de Varreduras:
 - Melanoma: 500 varreduras
 - Metástase: 500 varreduras
- Abertura do feixe de laser: 7 mm
- Resolução espectral: 4 cm^{-1}

A luz espalhada das amostras chega ao detetor, que converte a intensidade da luz em sinais elétricos, que são interpretados no computador na forma de espectro Raman. Após essa etapa, é realizada a conversão dos dados obtidos, pela expressão matemática da transformada de Fourier, produzindo espectro com seus picos característicos para a determinada amostra em estudo.



Figura 6 - Espectrômetro FT-Raman RFS 100 da Bruker[®]



Figura 7 - Compartimento de amostra com porta-amostra posicionado

A partir do *software* instalado no FT-Raman Spectrômetro RFS 100, OPUS[®] versão 4.2, Copyright © Bruker Optik GmHb 1997-2002, foi possível ajustar todos os parâmetros do equipamento, como potência do laser, abertura de feixe, ajuste na transformada de Fourier, auxílio durante a aquisição dos espectros, armazenamento e manipulação dos dados espectrais, gráficos em três dimensões (3D); análises quantitativas e armazenamento dos dados em forma de bibliotecas.

Após coleta dos espectros, o fragmento do tecido analisado foi imerso em tubo de plástico contendo formol a 10%, em volume 10 vezes maior que o volume da amostra. Os frascos contendo as amostras foram identificados e encaminhados para realização do exame histopatológico de confirmação de diagnóstico no Departamento de Patologia - UNIFESP.

4.2 - Método estatístico

Para a realização da análise estatística dos dados espectrais, os espectros foram divididos de acordo com o grupo histológico pertencente, formando os grupos: melanoma primário, melanoma metastático e pele normal. Dentro de cada um destes grupos, os espectros foram agrupados em unidades amostrais. Estas unidades foram construídas através do cálculo da média entre os espectros originais de cada paciente, para resumir dados e organizar a análise dos mesmos. Foram obtidas 10 unidades amostrais para Pele Normal, 10 unidades amostrais para Melanoma Primário e 09 unidades amostrais para Metástase.

Em seguida, foram investigadas algumas variáveis dentro dos espectros factíveis de classificação dos grupos do ponto de vista estatístico. Estas

variáveis foram baseadas nas informações sobre os compostos bioquímicos presentes nos tecidos analisados através da identificação dos mesmos nos espectros Raman. Esta identificação foi baseada na proposta de Gniadecka et al. (1997) modificada neste estudo pela inclusão das bandas identificadas (tabela 1- apêndice).

Após a identificação das bandas bioquímicas relevantes para análise estatística, o primeiro passo foi o emprego do modelo de análise de variância com um fator fixo, onde foram verificadas que todas as variáveis, ou modos vibracionais Raman, apresentavam relevante associação com cada grupo diagnóstico. Foi realizada descrição qualitativa dos espectros de pele normal, nevo pigmentado e melanoma primário, em relação à média, desvio-padrão, valor mínimo e valor máximo de cada um dos modos vibracionais relacionados (tabelas 2 e 3 - apêndice).

Gráficos *Box Plot* foram construídos para cada modo vibracional analisado (bandas 1 a 10), para ilustrar os resultados e melhorar a compreensão. Os gráficos mostraram claramente a distribuição das biomoléculas dentro de cada grupo estudado (figuras 32 a 41 - apêndice).

Para cada modo vibracional descrito foi calculado o nível descritivo para realização da análise multivariada dos espectros, assim todas as 10 variáveis fizeram parte da análise. O último passo do estudo estatístico foi o emprego da Análise Discriminante aos dados.

5 - RESULTADOS

Dez amostras do grupo controle (pele sem alterações clínicas e histopatológicas) de diferentes pacientes foram avaliadas, 105 espectros foram obtidos e agrupados (figura 8). Dez amostras do grupo melanoma primário e nove do grupo metástase foram estudadas dessas amostras foram obtidos, respectivamente, 140 e 126 espectros, e foram agrupados para realização da análise visual (figuras 9 e 10), que mostra padrões bem definidos nos três grupos, indicando uma diferenciação entre eles.

O grupo Melanoma Primário foi composto exclusivamente por espectros obtidos de amostras histologicamente avaliadas como melanoma cutâneo primário. Estas amostras foram obtidas de 10 pacientes diferentes (figura 9).

Comparando com a pele normal, os espectros de melanoma apresentaram diminuição na intensidade da banda amida I, com achatamento da área espectral entre 1640 e 1670 cm^{-1} , o que sugere mudança na composição molecular das proteínas. Na região entre 1475 a 1640 , ocorreu aumento na intensidade no grupo melanoma, correspondendo a proteínas e lipídios. Na região da banda 1200 a 1300 cm^{-1} ocorreu aumento da sua intensidade, essa área representa as moléculas de amida III e lipídios, e na banda que corresponde a molécula da melanina também houve aumento na intensidade (1300 a 1400 cm^{-1}). Na região correspondente a banda protéica entre 920 a 980 cm^{-1} ocorreu diminuição na intensidade. Na análise visual entre o grupo metástase e pele normal, as alterações nas bandas e picos são similares, porém foram marcantes.

Os espectros do grupo metástase apresentaram diferenças em relação ao grupo melanoma primário na banda amida I (1640 a 1670 cm^{-1}), onde no grupo metástase essa região apresentou diminuição da sua intensidade em relação ao

grupo melanoma primário. Aumento de intensidade na região amida III e lipídios (1222 a 1300 cm^{-1}) e também na área protéica entre 900 e 940 cm^{-1} no grupo metástase. Na banda correspondente a melanina houve um aumento da intensidade no grupo metástase (1300 a 1380 cm^{-1}).

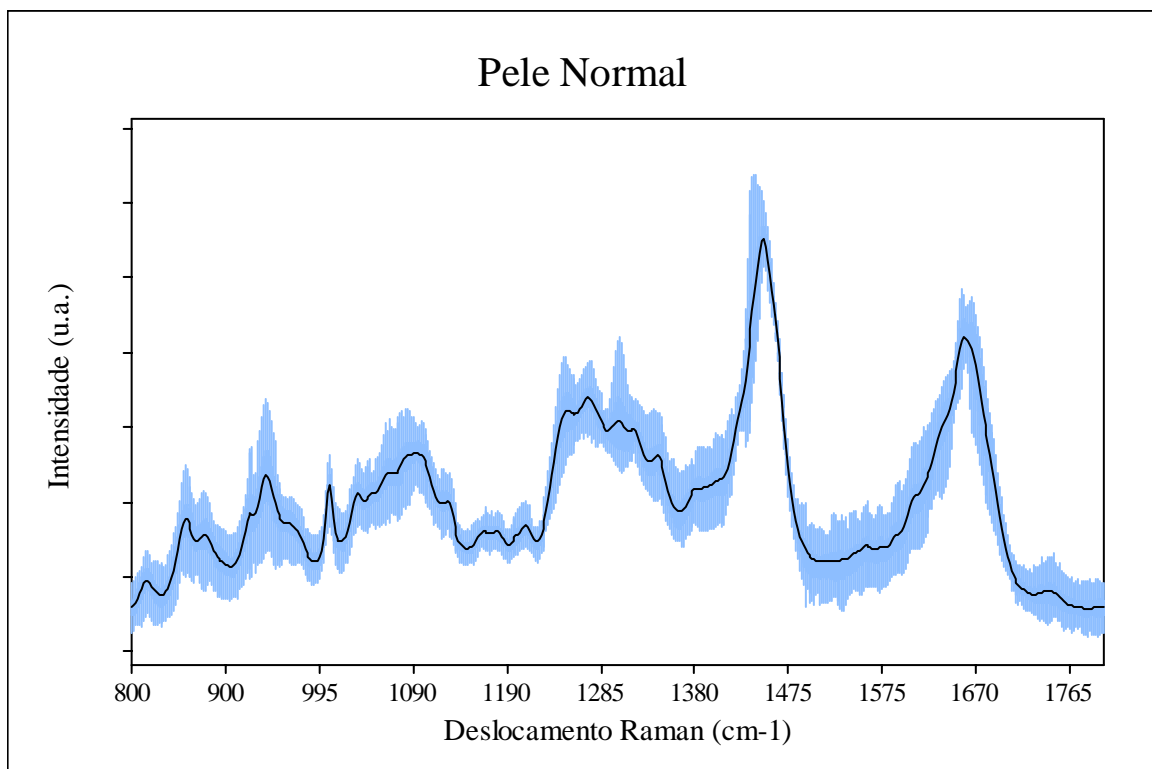


Figura 8 – Espectros do grupo controle (pele normal).

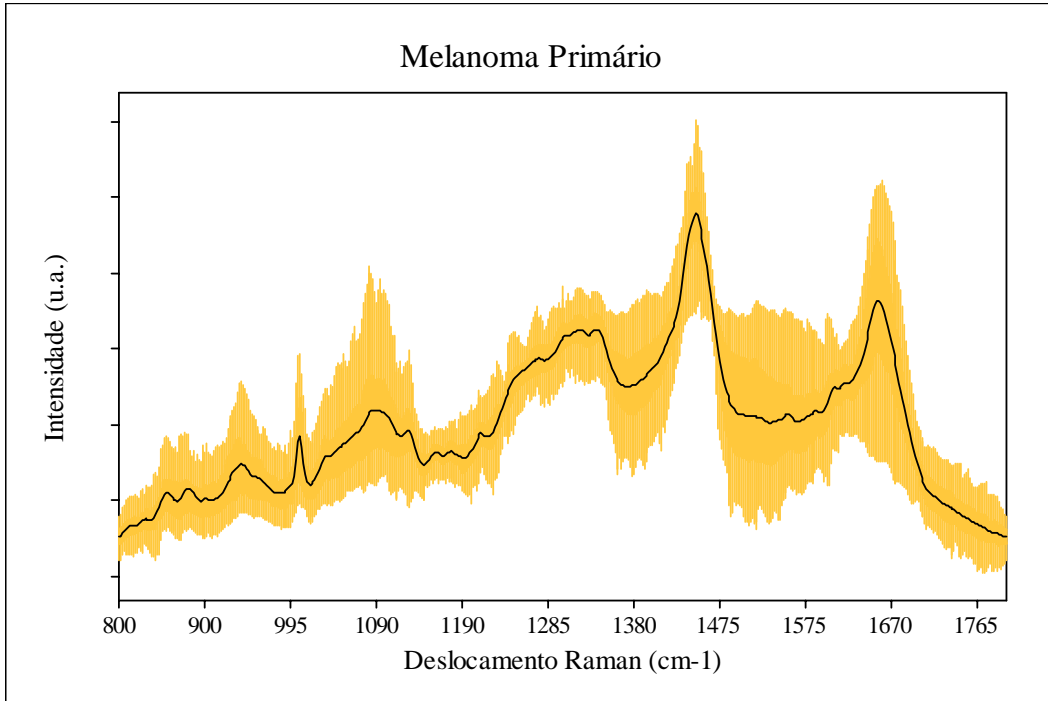


Figura 9 – Espectros do grupo melanoma primário.

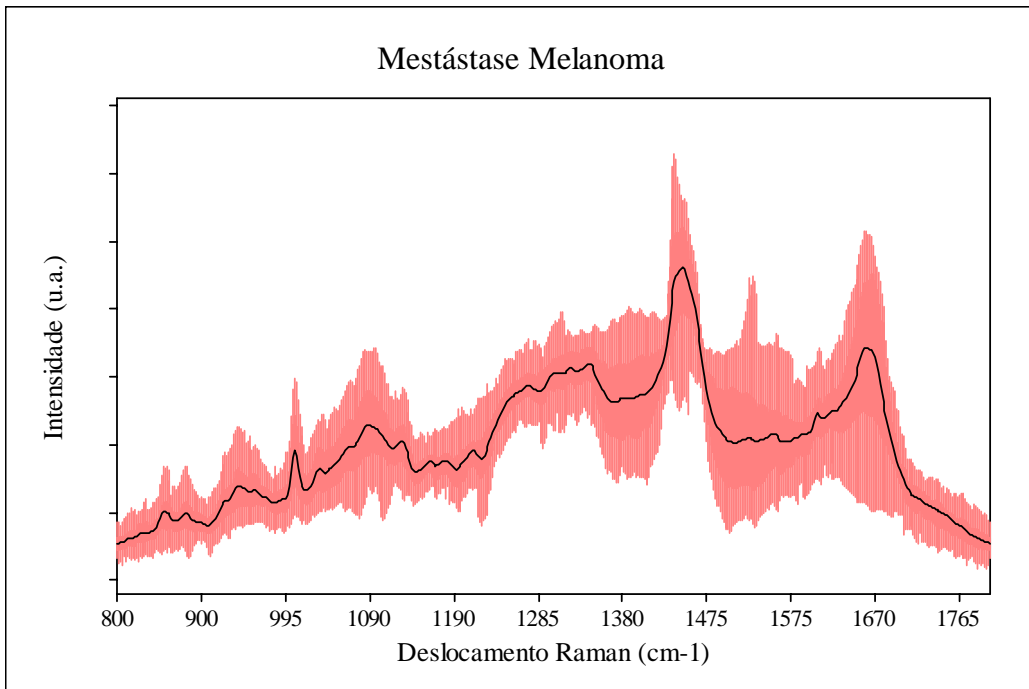


Figura 10 – Espectros do grupo melanoma metastático

Nas amostras 1, 2 e 9 do grupo melanoma metastático houve grande fluorescência devido a presença mais intensa de pigmento melanina, dificultando a visualização dos picos e bandas. No grupo melanoma primário, o mesmo evento ocorreu na nona amostra, mas o pico 1400 cm^{-1} é visível em todos os espectros. Esses espectros foram excluídos da análise visual dos dados, porém foram utilizados durante análise estatística.

A figura 11 mostra a mediana dos espectros do grupo melanoma e do grupo metástase. Visualmente, as diferenças nas bandas e picos são discretas.

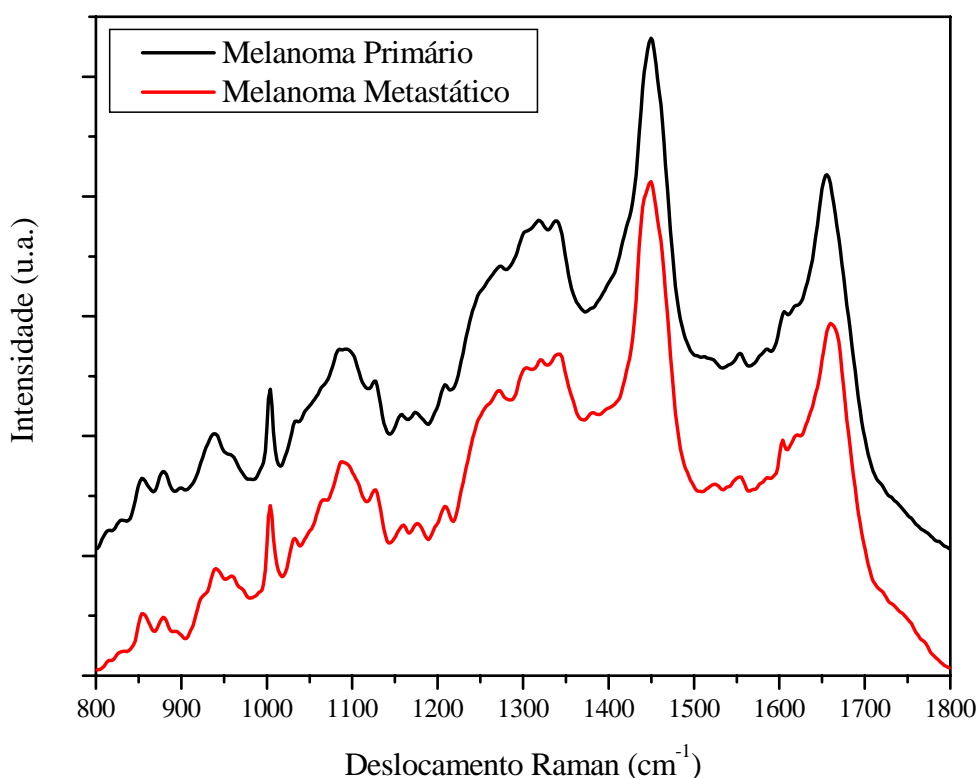


Figura 11 – Mediana dos espectros Raman de melanoma primário e melanoma metastático

As variáveis obtidas foram investigadas a partir do espectro em questão e sua possibilidade de diferenciar os grupos do ponto de vista estatístico. Em um primeiro momento, empregou-se o modelo de análise de variância com um fator fixo e verificou-se que todas as variáveis apresentavam associação com o grupo. Deste modo, todas as informações fizeram parte do processo de análise multivariada (figura 12).

Com a finalidade de diferenciar os três grupos formados na amostra de acordo com as características extraídas dos espectros, realizou-se uma análise discriminante dos dados. As variáveis Fenilalanina, DNA e Amida I destacaram-se na diferenciação dos três grupos (anexo). A porcentagem de indivíduos corretamente classificados com este critério foi de 93,1%; o que mostra a eficiência da análise realizada (figura 12).

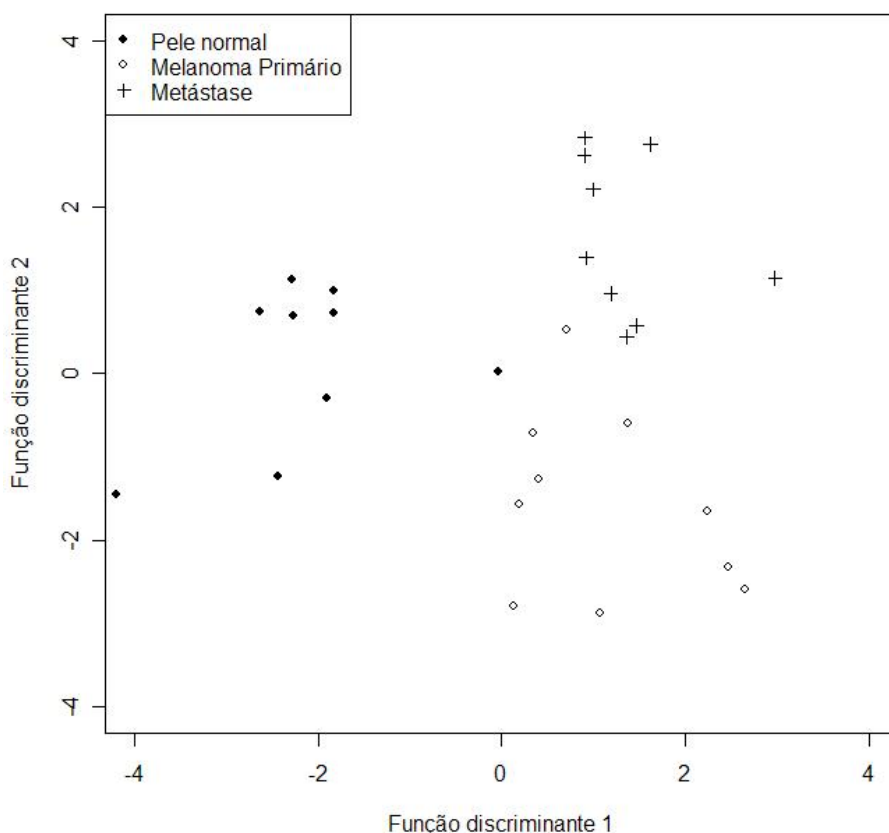


Figura 12 - Diferenciação dos grupos através das duas funções discriminantes obtidas.

6 – DISCUSSÃO

Aumento substancial na sobrevivência dos pacientes com melanoma cutâneo é evidente nas últimas décadas, porém não houve nenhum avanço dramático no tratamento do melanoma que possa explicar essa tendência. A maioria, se não toda a melhora na mortalidade parece ser causada pela detecção precoce do melanoma na população geral. Essa afirmativa foi encontrada em vários estudos epidemiológicos revisados, mostrando essa tendência nos países onde existe uma documentação adequada desses dados, por exemplo, Estados Unidos, Austrália e países da Europa como Alemanha e Itália (URIST & KARNELL, 1994; CHANG et al, 1998; WEINSTOCK, 2006).

No presente estudo pode-se afirmar que não houve prejuízo ao diagnóstico porque a casuística foi formada por lesões metastáticas e lesões primárias de grandes dimensões. As amostras foram imediatamente congeladas no nitrogênio líquido e descongeladas somente uma vez e submetidas ao experimento para evitar possíveis alterações que podem ser causadas nas células pelo processo de congelamento.

Os espectros coletados de pele sem alterações (grupo controle) estavam similares aqueles previamente publicados (GNIADCKA et al, 1997; EDWARDS, 1995). A banda da amida I ($1640-1700\text{ cm}^{-1}$) corresponde principalmente, ao modo de vibração de estiramento das ligações C=O, onde, C é carbono e O é oxigênio. Enquanto que, o modo vibracional da amida III ($1222-1362\text{ cm}^{-1}$), é denominado pela vibração no plano das ligações do N-H, onde N é nitrogênio e H é hidrogênio, e também, pelo estiramento do C-N. Ambas as regiões refletem assim, a estrutura secundária das proteínas (GNIADCKA et al, 1997). A estrutura

dos lipídios é representada pela vibração do CH₂ na região entre 1420 a 1500 cm⁻¹. As bandas em 855 e 937 cm⁻¹ são características típicas do espectro do colágeno e são devido à vibração da prolina e da vibração de estiramento do C-C na estrutura protéica (NIJSSEN et al., 2002).

O espectro Raman fornece uma impressão digital de uma substância a partir da qual a composição molecular pode ser determinada. Os espectros Raman de tecidos biológicos são compostos de bandas relativamente estreitas, entre 10-20 cm⁻¹ de extensão, o que demonstra a presença de várias moléculas. A contribuição das moléculas para o espectro Raman é proporcional a quantidade presente no tecido estudado. Isto explica a natureza quantitativa da informação que a espectroscopia Raman pode fornecer para caracterizar diferentes tipos de tecidos, ou diferenciar células malignas de células benignas (HANLON et al, 2000; NAUMANN, 2001).

Para explorar todo o potencial da informação quantitativa contida no espectro Raman deve-se utilizar vários métodos de análise e não apenas observar os picos proeminentes. Atualmente, as informações dos espectros podem ser analisadas através da estatística, da química e da morfologia (HANLON et al, 2000). No presente estudo foram avaliados visualmente os picos e bandas e análise estatística foi realizada.

Um espectro Raman pode incluir até mil pontos de intensidade, cada um representando um número de banda diferente. Cada pico de intensidade contém informação e a utilização dessa informação bioquímica útil é complexa e pode ser obtida por meio de técnicas matemáticas e estatísticas. No presente estudo, a análise estatística auxiliou para diminuição da subjetividade da observação dos dados,

demonstrou que existe uma maior heterogeneidade no grupo metástase, indicando que clones de células conseguem se diferenciar através de mutações a ponto de tornarem-se mais invasivas, portanto diferentes das células iniciais do grupo melanoma primário. Na banda correspondente a melanina, o grupo melanoma apresentou aumento da intensidade, mostrando o aumento da produção desse pigmento na neoplasia estudada; no grupo metástase, esse aumento foi um pouco mais intenso na área 1360 a 1400 cm^{-1} , mostrando que as células metastáticas podem manter a capacidade de produzir pigmento.

Laser Nd:YAG com comprimento de luz 1064 nm na espectroscopia próximo ao infravermelho fornece espectros de alta qualidade e livres de fluorescência (NAUMANN, 2001). Nos espectros de melanoma primário e metastático onde existia uma maior quantidade de pigmento negro (melanina), a fluorescência não foi abolida e para análise visual, os espectros foram excluídos. Porém, em todos os espectros, o pico 1400 cm^{-1} estava visível. Esse pico corresponde a moléculas de proteínas, inclusive melanina.

GNIADHECKA et al (2004) compararam espectros de lesões cutâneas pigmentadas benignas e malignas: queratose seborreica, nevo pigmentado, carcinoma basocelular pigmentado e melanoma. Os autores através da análise visual dos espectros conseguiram diferenciar as lesões e com o uso de sistema neural, a sensibilidade do diagnóstico do melanoma foi de 85% e a especificidade de 99%. A análise visual é subjetiva e demorada, porém com o auxílio da rede neural foi possível uma análise quantitativa dos espectros. O espectro de nevo pigmentado se assemelha ao de pele normal, mostrando uma diminuição na banda amida I, essa região também apresenta uma intensidade diminuída no melanoma e no carcinoma basocelular pigmentado. Os autores discutem baseado nessas observações que a transformação neoplásica nos tecidos pode desencadear mudanças celulares independente do tecido

envolvido e as alterações das bandas amida no espectro Raman foram atribuídas a mudanças na conformação das proteínas. No grupo melanoma, do atual estudo, as alterações examinadas visualmente foram semelhantes, ocorrendo diminuição na intensidade da banda amida I, com achatamento da área espectral entre 1640 e 1670 cm^{-1} ; porém no grupo metástase, essa diminuição é maior comparando com o grupo melanoma. Na banda amida III ocorreu aumento da sua intensidade, e no grupo metástase o aumento foi mais marcante. Podemos concluir que para uma célula tornar-se metastática um maior número de mutações e alterações protéicas precisam ocorrer.

Embora o efeito Raman tenha sido descoberto há 80 anos, foi necessário o desenvolvimento de tecnologia como a descoberta da luz laser para a difusão do seu uso no estudo dos materiais inorgânicos. Para sua aplicação nos tecidos orgânicos e em amostras de tecidos humanos um novo desenvolvimento tecnológico ocorreu, porém num período de tempo menor. Sistemas Raman construídos para estudos clínicos devem cumprir exigências como apresentar mobilidade, tempo de coleta dos espectros em segundos para evitar interferências como pulso e movimentos respiratórios dos pacientes e devem estar de acordo com normas de segurança hospitalares (MAHADEVAN-JANSEN & RICHARDS-KORTUM, 1996).

Para aplicação da espectroscopia Raman no diagnóstico de doenças o desenvolvimento de fibras ópticas é essencial. Elas devem possuir dimensões capazes de acoplar em agulhas, endoscópios, angioscópios e outros aparelhos clínicos na ordem de 1 a 2 mm; e para ter acesso a órgãos internos, o comprimento dos elementos das fibras deve possuir alguns metros. Finalmente, os materiais das fibras devem suportar os procedimentos de esterilização hospitalares. Estas exigências conduzem a problemas de mecânica e óptica ainda não resolvidos na atualidade (HANLON et al, 2000). No entanto, a pele é o maior órgão do ser humano e

de fácil acesso para exame em tempo real; talvez na área do diagnóstico dermatológico, essa tecnologia alcance um padrão de excelência rapidamente.

7- CONCLUSÃO

Os dados espectrais foram qualificados, sendo possível diferenciar o melanoma primário do melanoma metastático utilizando a espectroscopia Raman.

8 - REFERÊNCIAS

BALCH, C.M.; SOONG, S.; GERSHENWALD, J.E.; THOMPSON, J.F.; REINTGEN, D.S. ET AL – Prognostic factors analysis of 17.600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on cancer melanoma staging system. J Clin Oncol 2001; 19:3622-34.

BITTAR, R.A.; MARTINHO, H.; TIERRA-CRIOLLO C.J.; MOURÃO NETO, M.; MARTIN, A.A. – Biochemical analysis of human breast tissue using FT-Raman spectroscopy. J Biom Opt 2006; 11:1-8.

CARTER, R.A.B. – Estudo do tecido mamário humano ex vivo por espectroscopia Raman [dissertação mestrado]. São José dos Campos: Universidades do Vale do Paraíba; 2004.

CHANG, A.E.; KARNELL, H.R.; MENCK H.R. – The National Cancer Data Base Report on cutaneous e noncutaneous melanoma: a summary of 84.836 cases from the past decade. Cancer 1998; 83: 299-302.

CHOO-SMITH, L.P.; EDWARDS, H.G.M.; ENDTZ, H.P.; KROS, J.M.; BARR, H.; ROBINSON JUNIOR, J.S.; BRUINING, H.A.; PUPPELS, G.J. – Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation. Biopolymers 2002, 67: 1-9.

EDWARDS, H.G.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. – Potencial applications of FT-Raman spectroscopy for dermatological diagnostics. J Mol Struct 1995; 347: 379-88.

GARBE, C.; EIGENTLER, T.K. – Diagnosis and Treatment of Cutaneous Melanoma: State of the art 2006. Melan Res 2007; 17:117-27.

GNIADDECKA, M.; WULF, H. C.; MORTENSEN, N.N.; NIELSEN, O.F.; CHRISTENSEN, D.H. - Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Raman spectroscopy. J Raman Spectrosc 1997; 28: 125-9.

GNIADDECKA, M.; PHILIPSEN, P.A. SIGURDSSON, S.; WESSEL, S.; NIELSEN, O.F.; CHRISTENSEN, D.H.; HERCOGOVA, J.; ROSSEN, K.; THOMSEN, H.K.; GNIADDECKI,R.; HANSEN, L.K.; WULF, H.C. – Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. J Invest Dermatol 2004; 122:443-449.

HANLON, E.B.; MANOHARAN, R.; KOO, T-W.; SHAFER, K.E.; MOTZ, J.T.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J.R.; ITZKAN, I.; DASARI, R.R.; FELD, M.S. – Prospects for in vivo Raman spectroscopy. Phys Med Biol 2000; 45:R1-R59.

HUANG, Z.; LUI, H.; CHEN, X.K.; McLEAN, A.A.D.I.; ZENG, H. – Raman spectroscopy of *in vivo* cutaneous melanin. J Biomed Optics 2004; 9:1198-1205.

KNUDSEN, L.; JOHANSSON, C.K.; PHILIPSEN, P.A.; GNIADDECKA, M.; WULF, H.C. - Natural variations and reproducibility of in vivo near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of normal human skin. J Raman Spectrosc 2002; 33: 574-9.

LANG Jr., P.G. – Malignant melanoma. Med Clin Nort Am 1998; 82:1325-58.

LAWSON, E.E.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C.; EDWARDS, H.G.M. – Biomedical applications of Raman spectroscopy. J Raman Spectrosc, 28: 111-7, 1997.

MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R - Raman Spectroscopy for the Detection of Cancers and Precancers. Journal of Biomedical Optics 1996; 1: 31-70.

MARKOVIC, S.N.; ERICKSON, L.A.; RAO, R.D.; WEENIG, R.H.; POCKAJ, B.A. et al – Malignant Melanoma in the 21st century, part2: staging, prognosis, and treatment. Mayo Clin Proc 2007; 82:490-513.

- MARKS, R. – Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25:459-63.
- MENZIES, S.W. – Cutaneous melanoma: making a clinical diagnosis, present and future. *Dermatol Ther* 2006; 19:32-9.
- NAUMANN, D. – FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectrosc Reviews* 2001; 36: 239-298.
- NIJSSEN, A.; SCHUT, T.C.B.; HEULE, F.; CASPERS, P.J.; HAYES, D.P.; NEUMANN, M.H.A.; PUPPELS, G.J. – Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 64-69.
- NUNES, L.A.; MARTIN, A.A.; SILVEIRA JUNIOR, R. - FT-Raman Spectroscopy study for skin cancer diagnosis. *Spectroscopy-An International Journal* 2003; 17: 546-53.
- PICCOLO, D.; FERRARI, A.; PERIS, K.; DAIDONE, R.; RUGGERI, B.; CHIMENTI, S. – Dermoscopic diagnosis by trained clinician vs. a clinician with minimal dermoscopy training vs computer-aided diagnosis of 341 pigmented skin lesions: a comparative study. *British J Dermat* 2002; 147: 481-486.
- PEREIRA, R.M.F.; MARTIN, A.A.; TIERRA-CRIOULO, C.J.; SANTOS, I.D.A.O. - Diagnosis of squamous cell carcinoma of human skin by Raman spectroscopy. *SPIE* 2004; 5326:106-112.
- RIKER, A.I.; GLASS, F.; PEREZ, I.; CRUSE, C.W.; MESSINA, J.; SONDAK, V.K. – Cutaneous melanoma: methods of biopsy and definitive surgical excision. *Dermatol Ther* 2005; 18: 387-93.
- SALA, O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. São Paulo: UNESP, 1995.
- SCHUT, T. C. B.; WOLTHUIS, R.; CASPERS, G. J. Real-time tissue characterization on the basis of in vivo Raman spectra. *J Raman Spectrosc* 2002; 33: 580-585.

SLATER, D.N. - Doubt and uncertainty in the diagnosis of melanoma. *Histopathology* 2000; 37:469-472.

STONE, N.; KENDALL, C; SHEPHERD, N; CROW, P.; BARR, H. – Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers. *J Raman Spectrosc* 2002; 33:564-73.

THOMPSON, J.F.; SCOLYER, R.A.; KEFFORD, R.F. – Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005, 365: 687-701.

URIST, M.M.; KARNELL,L.H. – The National Cancer Data Base Report on Melanoma. *Cancer* 1994, 74: 782-8.

VERONESE, L.A.; MARQUES, M.E.A. – Critérios anatomopatológicos para melanoma maligno cutâneo: análise qualitativa de sua eficácia e revisão da literatura. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40:99-112.

WEINSTOCK, M.A. – Cutaneous melanoma: public health approach to early detection. *Dermatol Ther* 2006, 19: 26-31.

NORMAS ADOTADAS

FERREIRA, L.M. – Orientação Normativa para Elaboração de Teses. 1ª ed. São Paulo, Editora CEDCP, 2006.

GOLDENBERG, S.- Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos Científicos. São Paulo:2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org.br>

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Ed Manole Ltda;2001.248p.

Consulta ao DeCs – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: www.bireme.br – Terminologia em saúde.

SUMMARY

Introduction: The prognostic of a patient with cutaneous melanoma is linked to an early diagnosis followed by the excision of the lesion; thus, an early detection is essential. The Raman spectroscopy is an optical technique which supplies information about the molecular vibrations of a sample. This technique uses a laser light, which is conducted through optical fibers, as a tool to investigate in a non-destructive way the biological tissues and, thus; it makes it possible to carry out a non-invasive analysis of the lesion in real time.

Objective: The objective of this study was to qualify the FT-Raman spectral data of primary and metastatic cutaneous melanoma in order to obtain a differential diagnosis. **Methods:** Samples of 10 skin fragments without clinical alterations or histopathology were used, as well as 10 cutaneous melanomas and 9 lymphonodal metastasis samples. After the surgical procedure, the samples were identified and individually stored in tubes and were conserved in liquid nitrogen. The samples were thawed in a physiological solution at 0,9%. Each sample was divided in 2 or 3 fractions of 2 mm³ each and placed and positioned at the sample carrier in order to obtain the Raman spectrum; a monochrome laser light Nd:YAG of 1064 nm was applied to the sample. With aid of the OPUS, five different collection points for sample FT-Raman were electronically selected, at a distance of 250 m. The entire collection was accomplished in less than 10 minutes. The dispersed light of the samples arrives at the detector, which converts the light in electric signs, and then these signs are read by computer in the Raman spectrum form. **Results:** The visual analysis of the spectra showed differences among the studied groups, mainly in the bands and picks of the Raman spectrum which corresponded to the proteins. To differentiate the three groups formed according to the characteristics extracted from the spectra, we made a discriminative analysis of the data. The phenylalanine, DNA and Starch-I variables stood out in the differentiation of the three groups. The percentages of correctly classified items with this criterion was of 93,1%; what comes to show the efficiency of the analysis. **Conclusion:** The FT-Raman spectroscopy is capable of differentiating the melanoma from its metastasis, as well as from normal skin.

APÊNDICE

Tabela 1 - Modos Vibracionais e Biomoléculas relacionadas aos espectros de Pele Normal, Nevo Pigmentado e Melanoma Primário (Modificado de Gniadecka, 1997).

Banda	Pele Normal (cm⁻¹)	Metastáse (cm⁻¹)	Melanoma (cm⁻¹)	Modos Vibracionais	Biomoléculas Gniadecka et al. (1997)
1	813, 855, 876	834, 855	807, 822	810 - 860	Polissacarídeos
2	921, 940, 957	919, 940, 955	934, 955, 984	900 - 985	Aminoácidos, Valina e Prolina.
3	1004	1004	1004	1003 - 1005	Fenilalanina (anel)
4	1033, 1047, 1067, 1096, 1125	1031, 1067, 1086, 1127	1032, 1046, 1079, 1096, 1121	1021 - 1144	PO ₂ ⁻ , Ácidos Nucleicos.
5	1160, 1168, 1206	1160, 1169, 1210	1158, 1173, 1221	1144 - 1222	Tirosina
6	1247, 1270, 1312, 1335, 1343	1243, 1268, 1302, 1314, 1339	1235, 1248, 1316, 1328, 1341	1222 - 1362	Lipídios, Proteínas, Amido-III.
7	1312, 135, 1343, 1384	1314, 1339, 1393	1316, 1328, 1341	1300 - 1400	Adenina e Fenilalanina (Melanina)
8	1451, 1544	1451, 1526, 1547	1407, 1451, 1526	1400 - 1560	Proteínas e Lipídios
9	1619	1576, 1588, 1619	1582, 1598, 1621	1560 - 1620	DNA (Adenina, Guanina, Fenilalanina, Melanina)
10	1663, 1748	1661	1663	1640 - 1800	Lipídios e Amida I (Proteínas)

Espectros do grupo melanoma primário

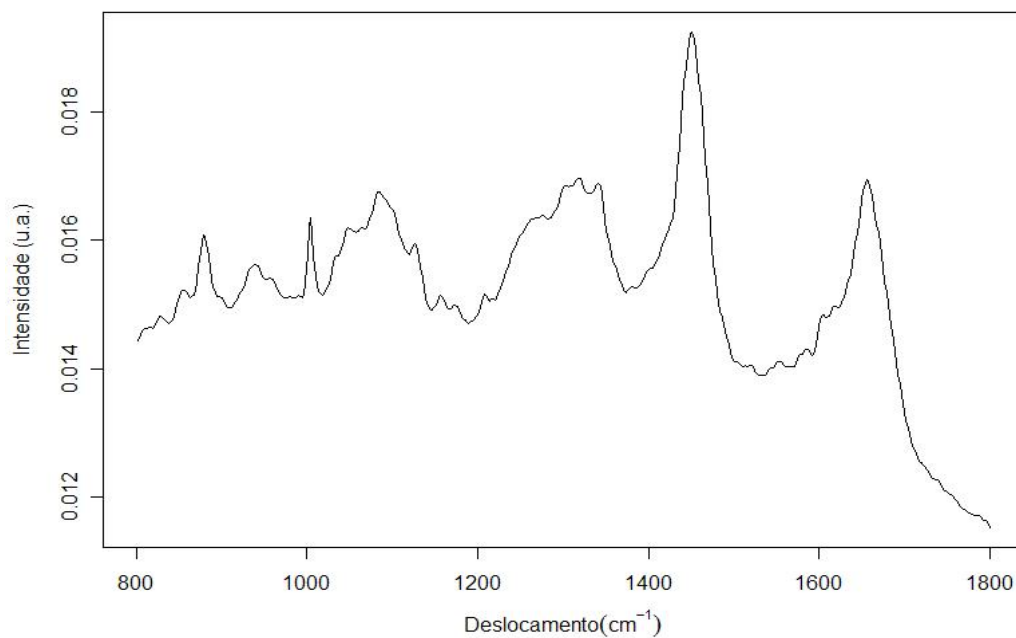


Figura 13 - Espectro da primeira unidade amostral do grupo melanoma primário.

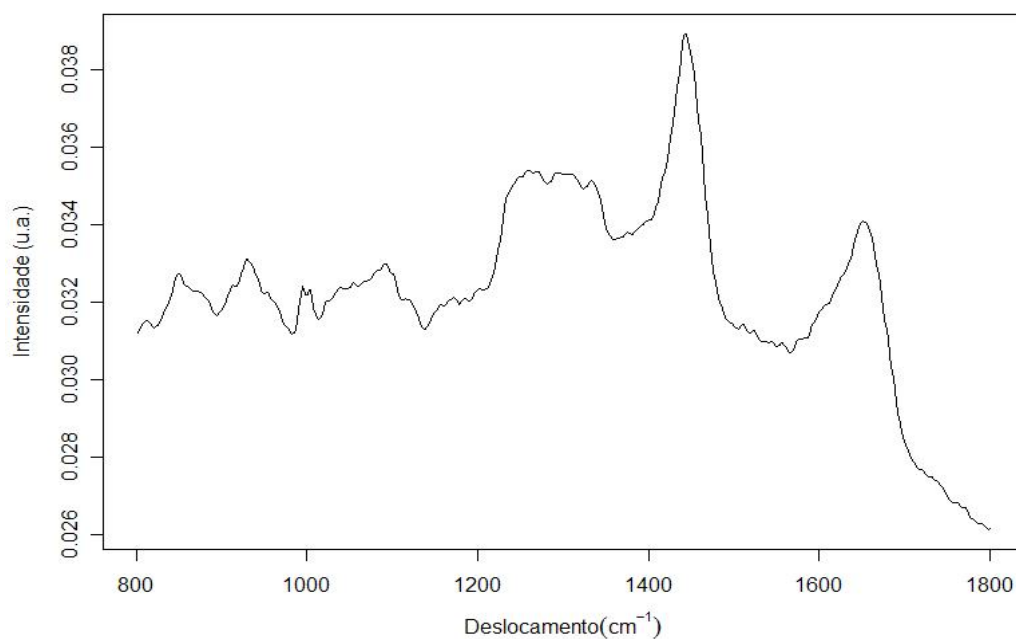


Figura 14 - Espectro da segunda unidade amostral do grupo melanoma primário.

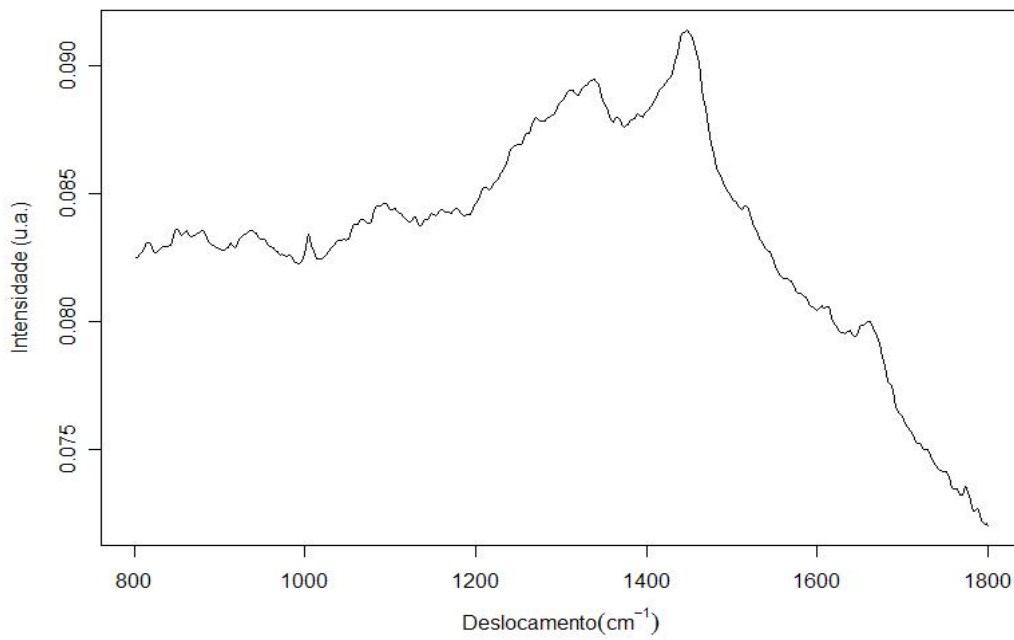


Figura 15 - Espectro da terceira unidade amostral do grupo melanoma primário.

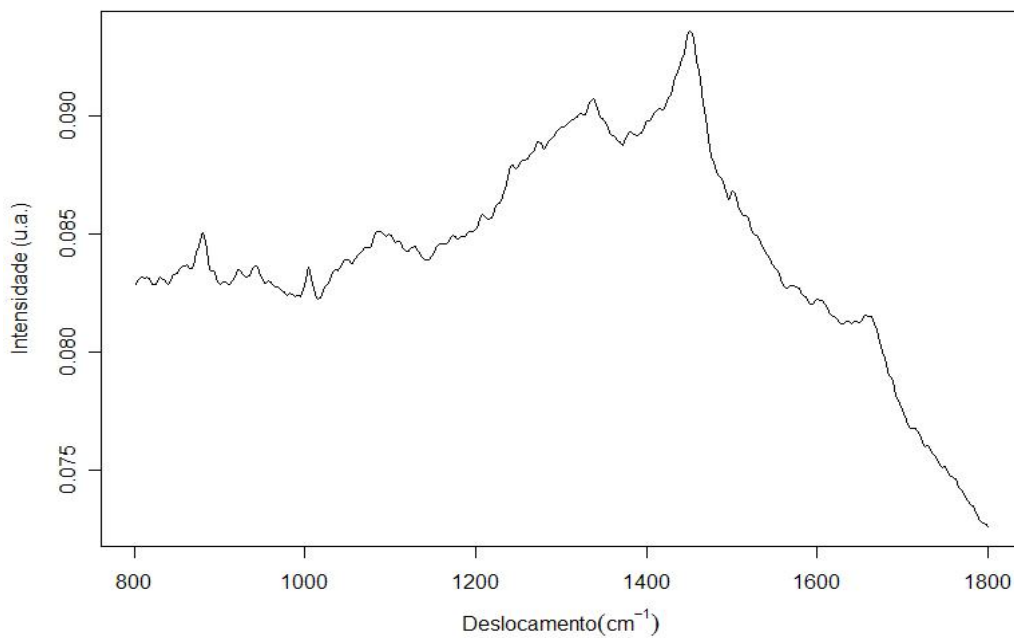


Figura 16 - Espectro da quarta unidade amostral do grupo melanoma primário.

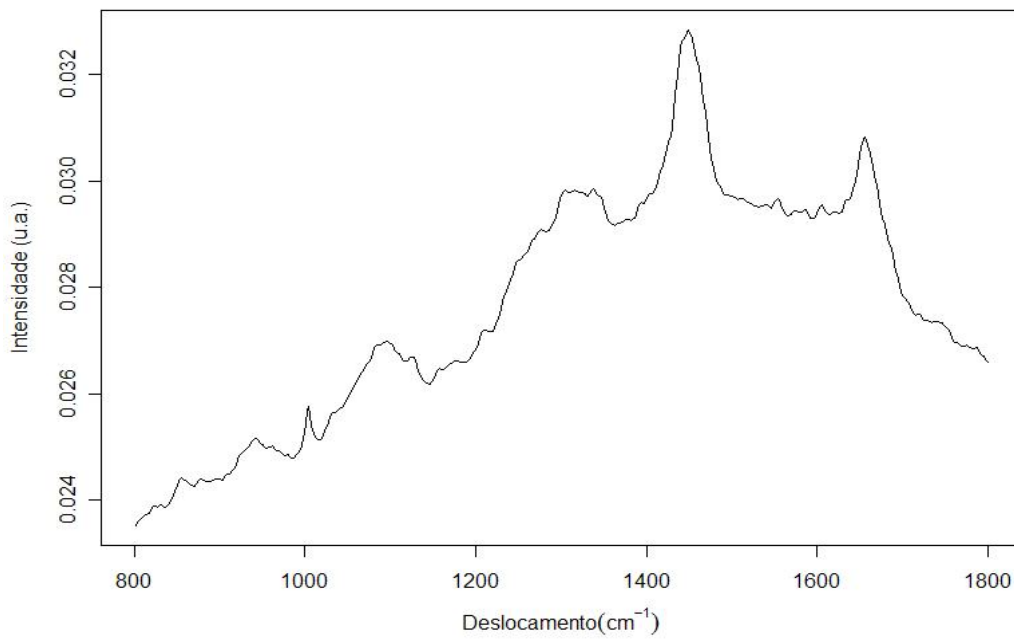


Figura 17 - Espectro da quinta unidade amostral do grupo melanoma primário.

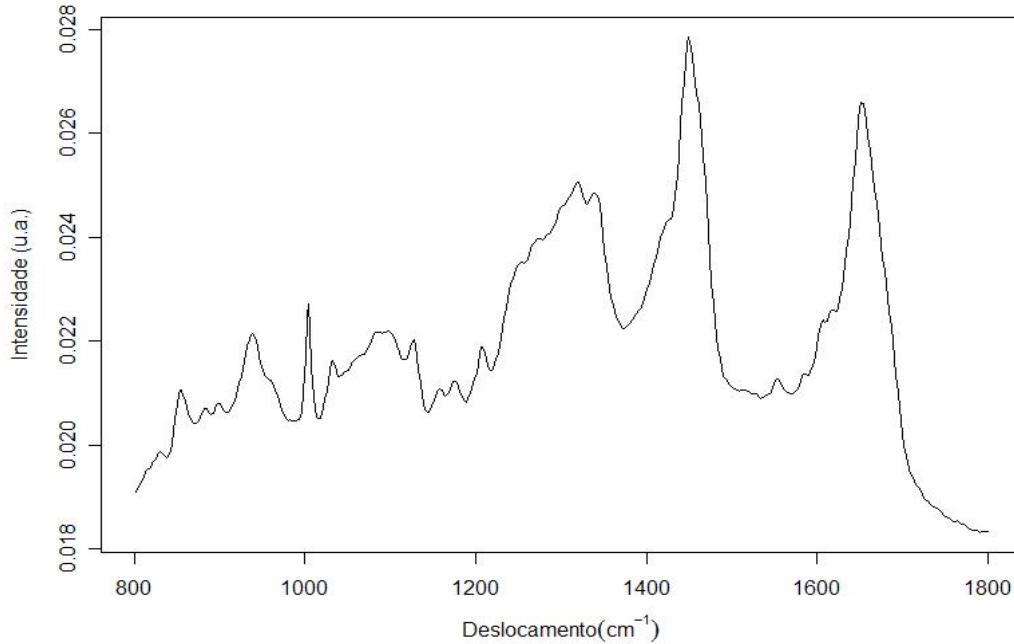


Figura 18 - Espectro da sexta unidade amostral do grupo melanoma primário.

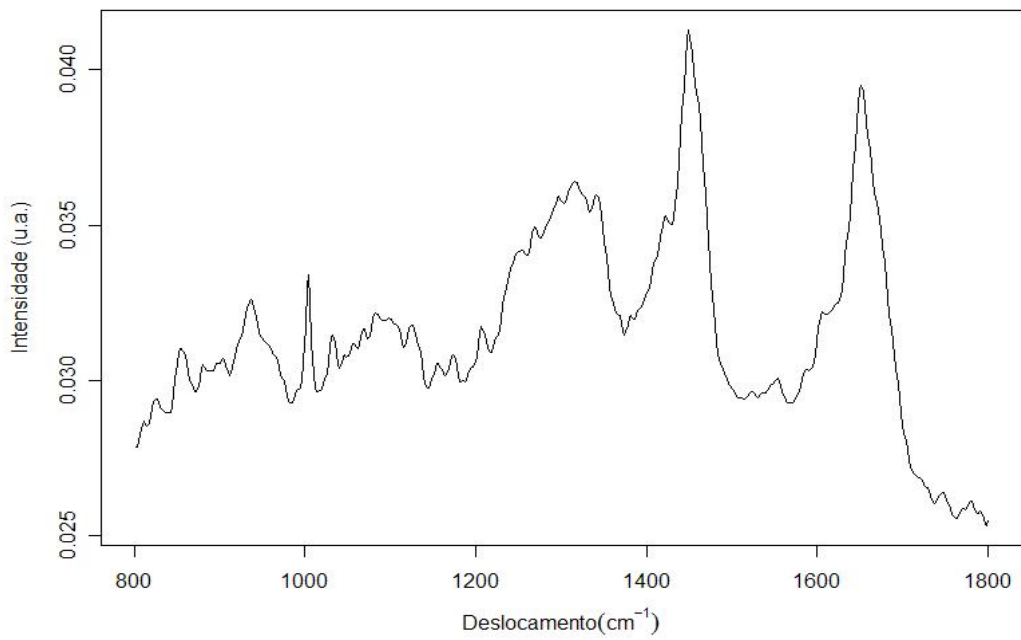


Figura 19 - Espectro da sétima unidade amostral do grupo melanoma primário.

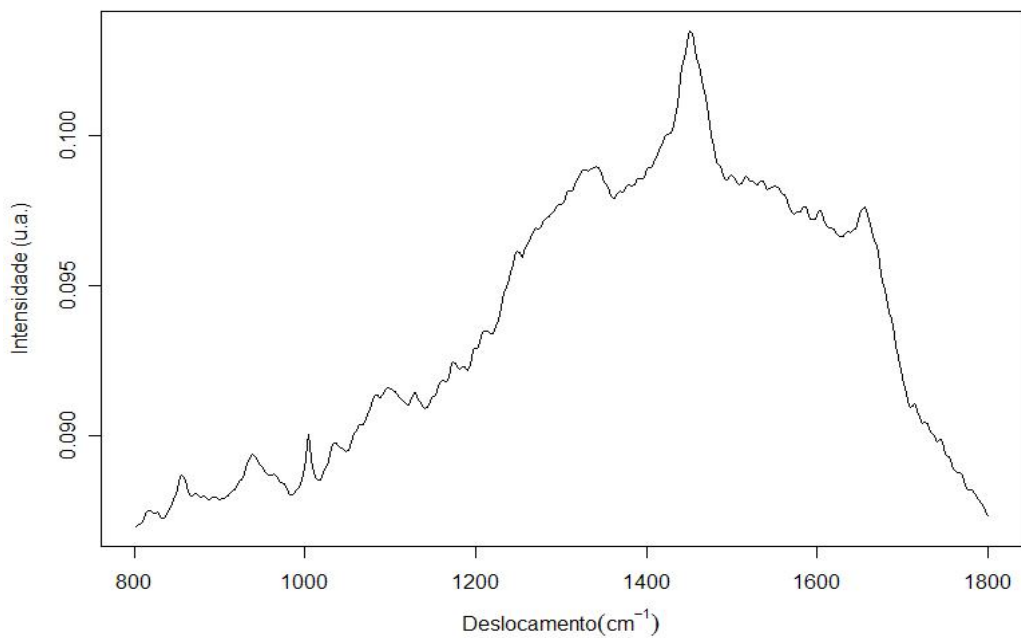


Figura 20 - Espectro da oitava unidade amostral do grupo melanoma primário.

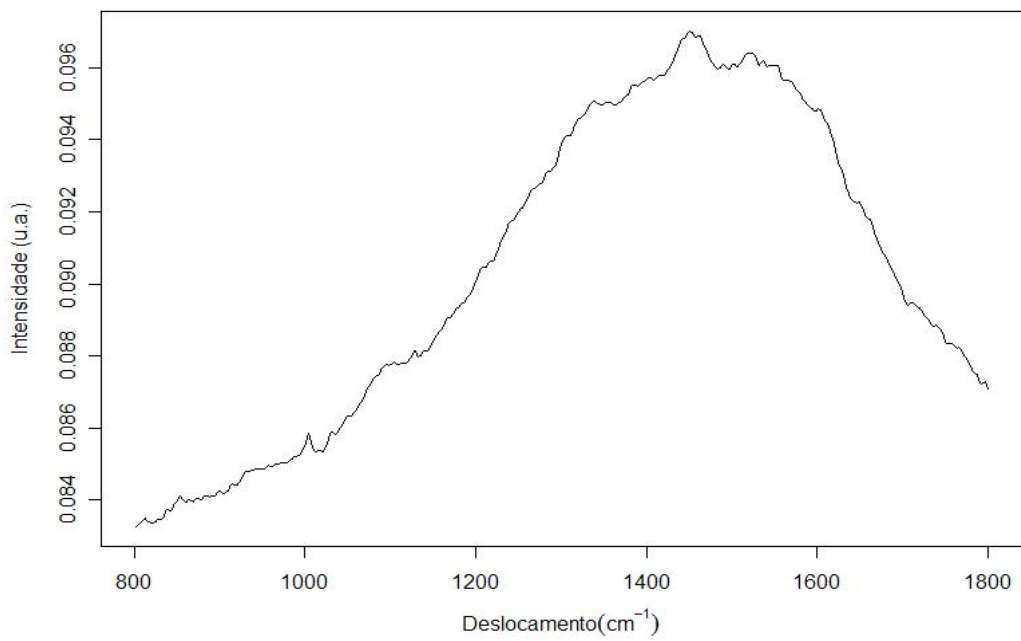


Figura 21 - Espectro da nona unidade amostral do grupo melanoma primário.

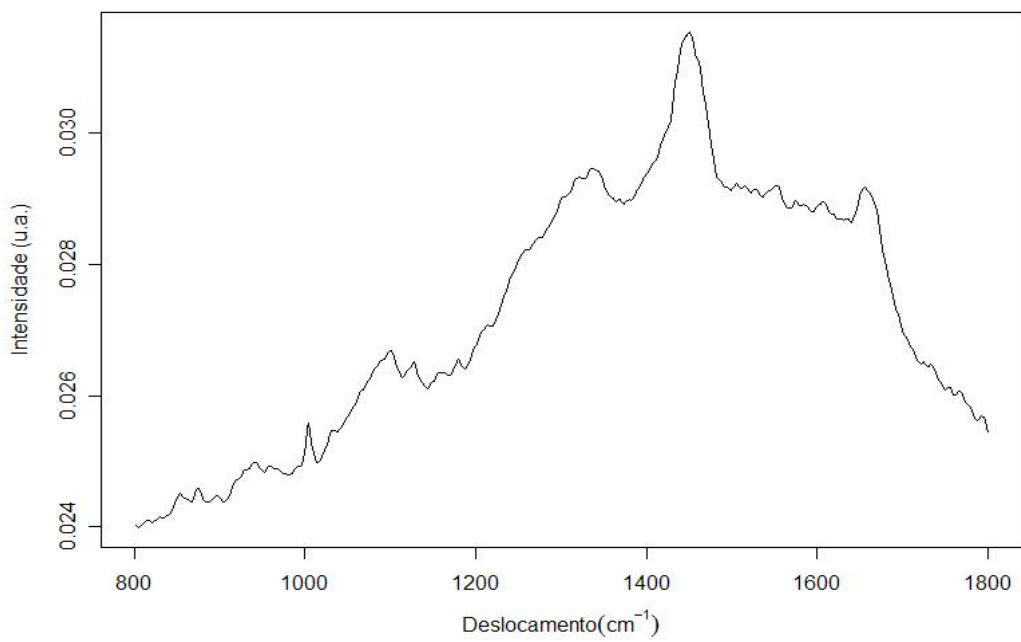


Figura 22 - Espectro da décima unidade amostral do grupo melanoma primário.

Espectros do grupo melanoma metastático

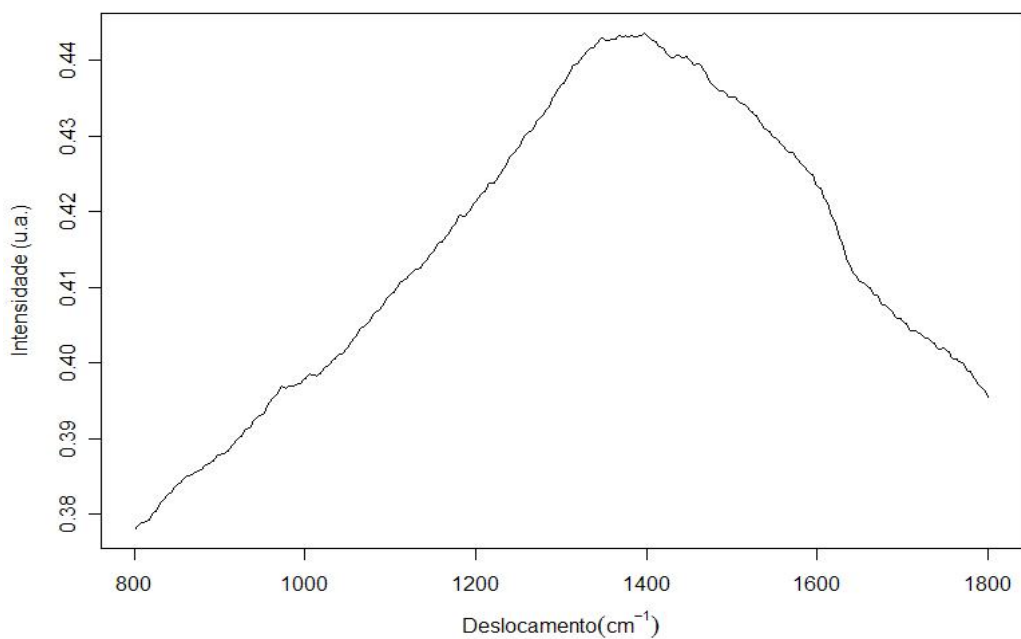


Figura 23 - Espectro da primeira unidade amostral do grupo melanoma metastático.

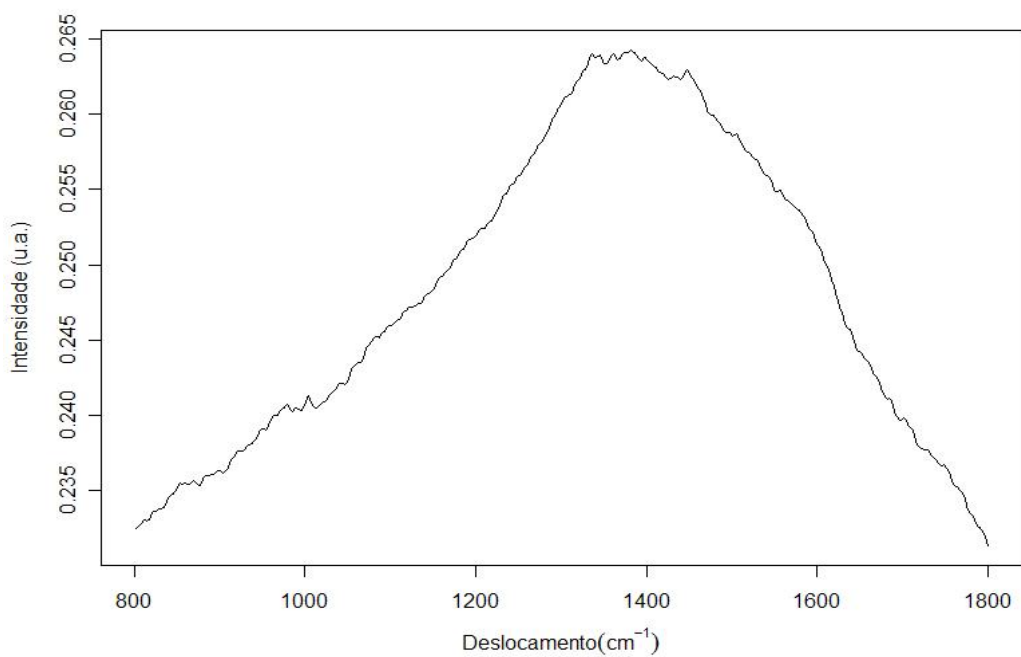


Figura 24 - Espectro da segunda unidade amostral do grupo melanoma metastático.

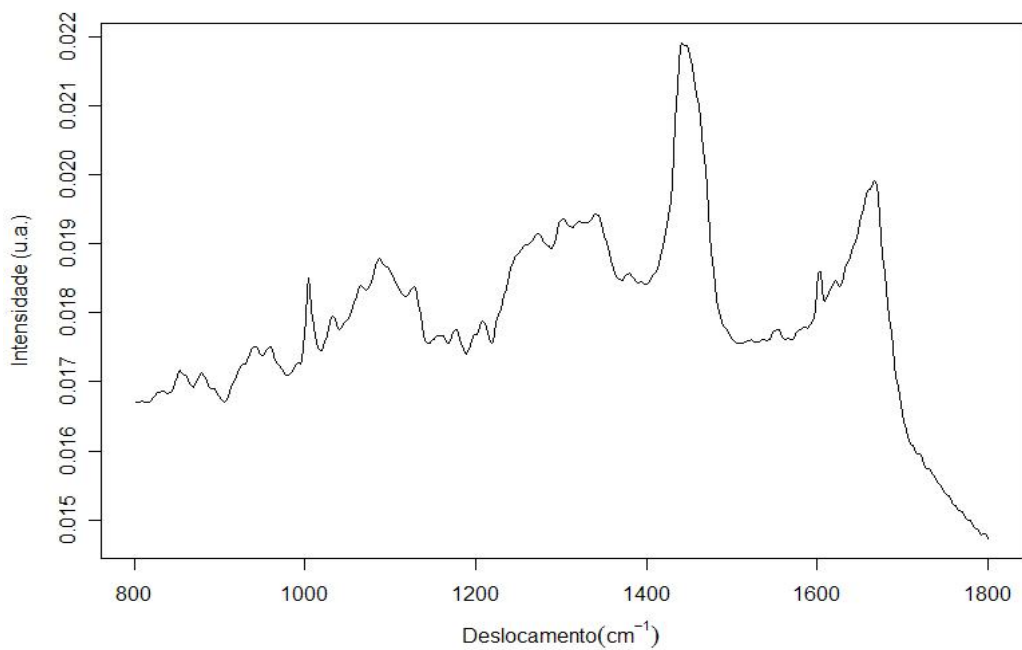


Figura 25 - Espectro da terceira unidade amostral do grupo melanoma metastático.

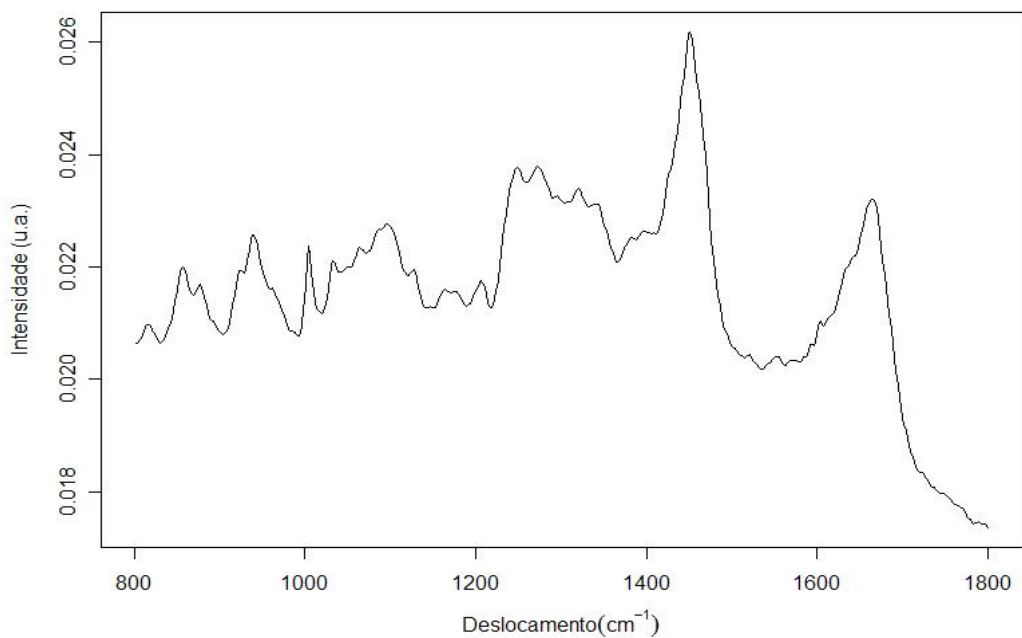


Figura 26 - Espectro da quarta unidade amostral do grupo melanoma metastático.

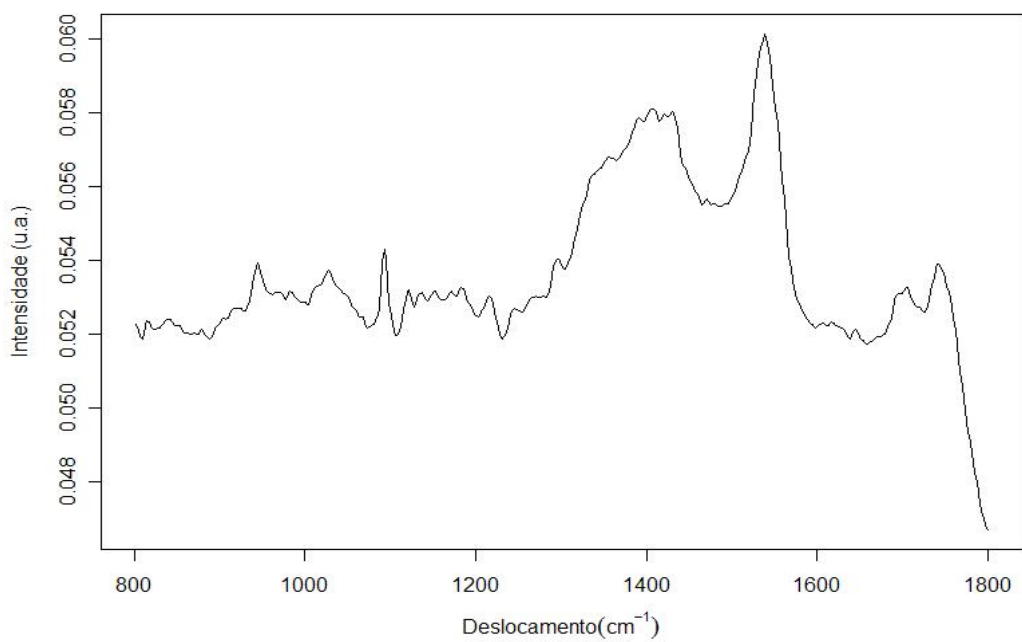


Figura 27 - Espectro da quinta unidade amostral do grupo melanoma metastático.

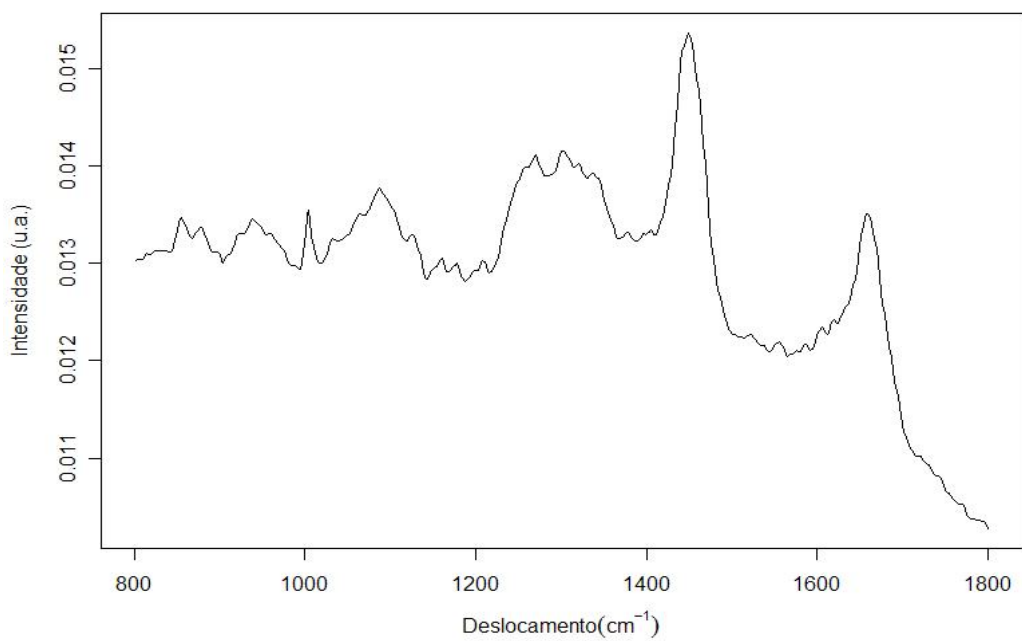


Figura 28 - Espectro da sexta unidade amostral do grupo melanoma metastático.

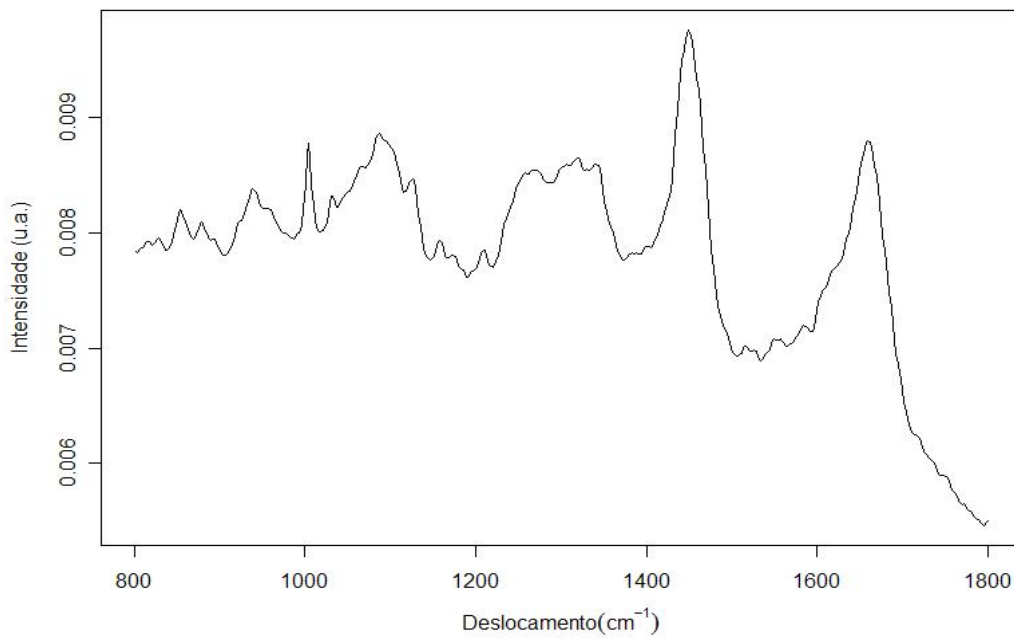


Figura 29 - Espectro da sétima unidade amostral do grupo melanoma metastático.

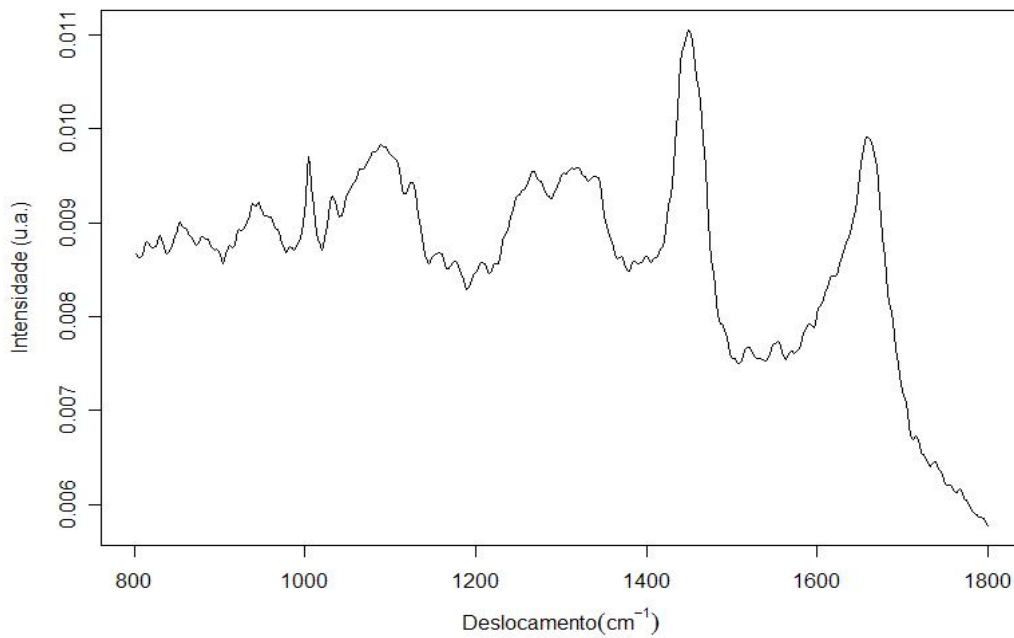


Figura 30 - Espectro da oitava unidade amostral do grupo melanoma metastático.

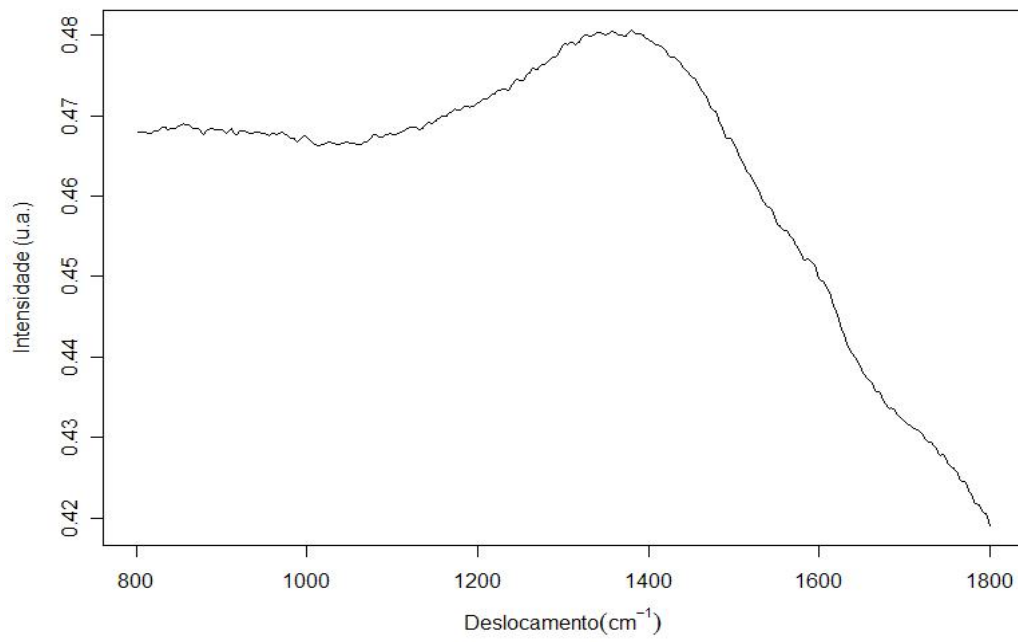


Figura 31 - Espectro da nona unidade amostral do grupo melanoma metastático

Tabela 2- Medidas descritivas das variáveis estudadas, em cada grupo.

		Polissacarídeos	Aminoácidos, Valina e Prolina	Fenilalanina	PO2, Ácidos nucléicos	Tirosina
Pele Normal	Média	0,0150	0,0161	0,0172	0,0169	0,0152
	Desvio-padrão	0,0069	0,0071	0,0073	0,0075	0,0081
	Mínimo	0,0085	0,0092	0,0103	0,0103	0,0076
	Máximo	0,0318	0,0334	0,0351	0,0353	0,0352
Melanoma Primário	Média	0,0482	0,0489	0,0499	0,0499	0,0503
	Desvio-padrão	0,0315	0,0314	0,0312	0,0318	0,0327
	Mínimo	0,0148	0,0153	0,0164	0,0160	0,0150
	Máximo	0,0877	0,0886	0,0900	0,0906	0,0924
Metástase	Média	0,1339	0,1357	0,1369	0,1381	0,1400
	Desvio-padrão	0,1812	0,1831	0,1838	0,1857	0,1896
	Mínimo	0,0080	0,0081	0,0088	0,0084	0,0078
	Máximo	0,4684	0,4678	0,4668	0,4674	0,4709
Total	Média	0,0633	0,0645	0,0656	0,0659	0,0661
	Desvio-padrão	0,1106	0,1116	0,1120	0,1132	0,1158
	Mínimo	0,0080	0,0081	0,0088	0,0084	0,0076
	Máximo	0,4684	0,4678	0,4668	0,4674	0,4709

Tabela 3- Medidas descritivas das variáveis estudadas, em cada grupo.

Grupo		Lipídios, Proteínas, Amido- III	Adenina e Fenilalanina	Proteínas e Lipídios	DNA	Amido I
Pele Normal	Média	0,0180	0,0160	0,0186	0,0144	0,0192
	Desvio-padrão	0,0082	0,0089	0,0085	0,0093	0,0081
	Mínimo	0,0104	0,0076	0,0103	0,0059	0,0117
	Máximo	0,0384	0,0383	0,0401	0,0377	0,0395
Melanoma Primário	Média	0,0535	0,0533	0,0548	0,0513	0,0519
	Desvio-padrão	0,0335	0,0344	0,0342	0,0334	0,0312
	Mínimo	0,0163	0,0153	0,0165	0,0143	0,0162
	Máximo	0,0972	0,0984	0,1005	0,0976	0,0966
Metástase	Média	0,1444	0,1461	0,1451	0,1391	0,1350
	Desvio-padrão	0,1939	0,1965	0,1940	0,1872	0,1796
	Mínimo	0,0084	0,0078	0,0084	0,0072	0,0084
	Máximo	0,4773	0,4801	0,4741	0,4529	0,4370
Total	Média	0,0695	0,0693	0,0703	0,0658	0,0664
	Desvio-padrão	0,1182	0,1202	0,1183	0,1147	0,1092
	Mínimo	0,0084	0,0076	0,0084	0,0059	0,0084
	Máximo	0,4773	0,4801	0,4741	0,4529	0,4370

Gráficos Box Plot

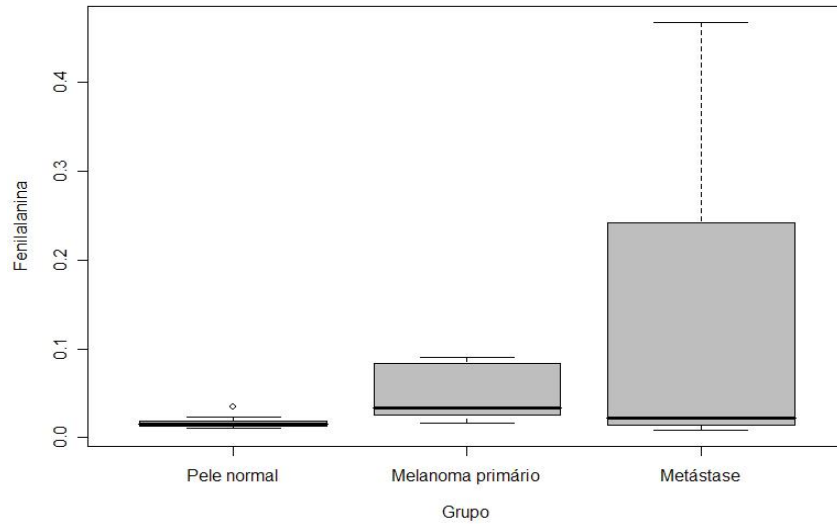


Figura 32 - Distribuição da variável Fenilalanina em cada grupo estudado.

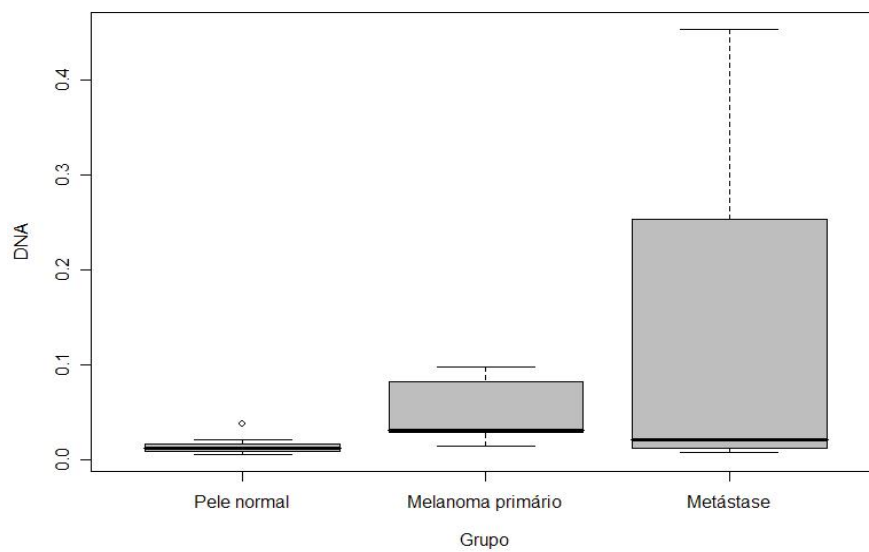


Figura 33 - Distribuição da variável DNA em cada grupo estudado.

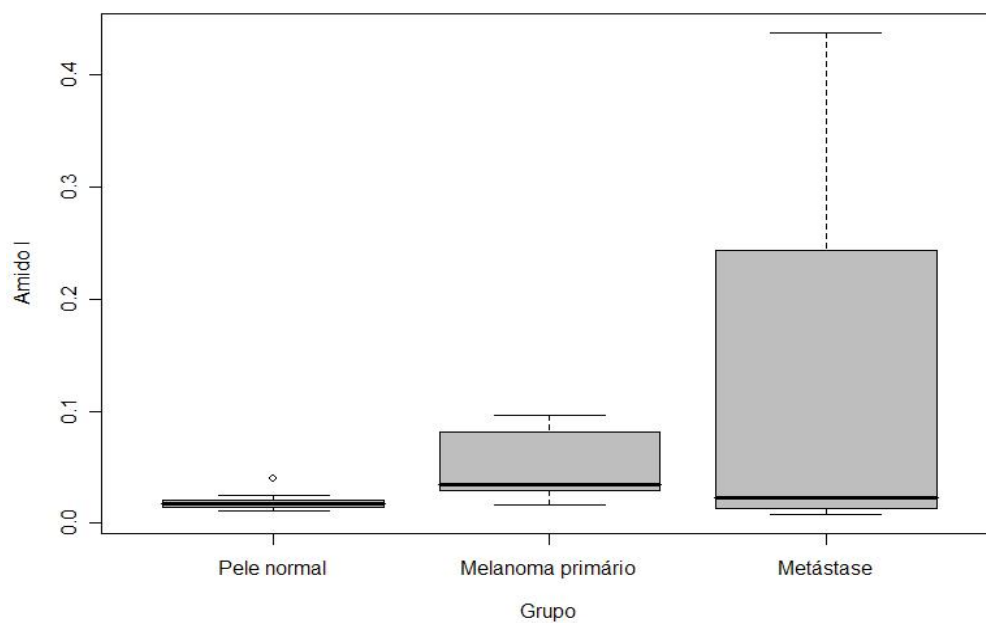


Figura 34 - Distribuição da variável Amida I em cada grupo estudado

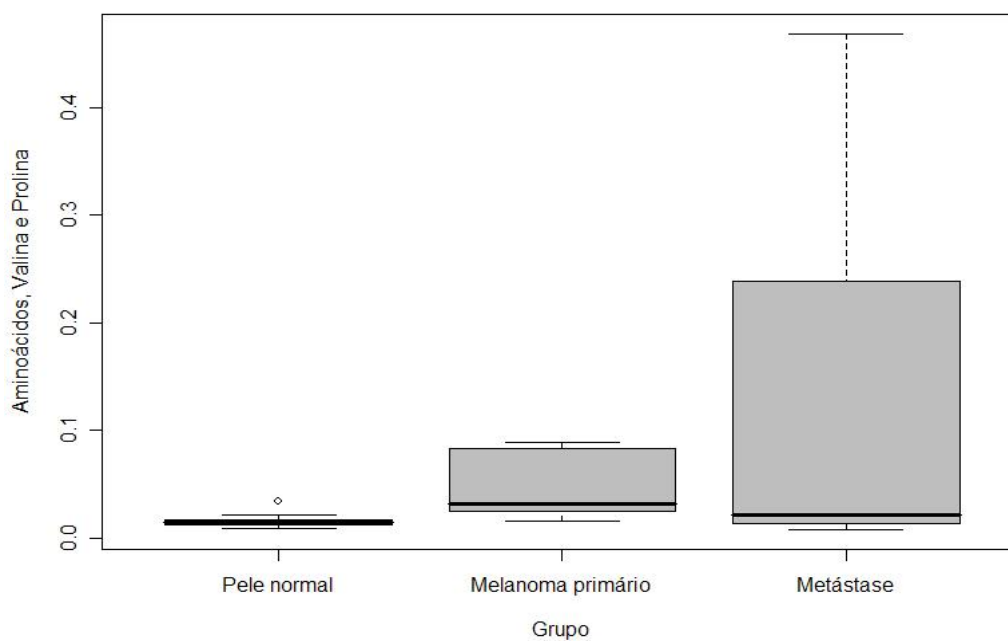


Figura 35- Distribuição da variável Aminoácidos, Valina e Prolina em cada grupo estudado.

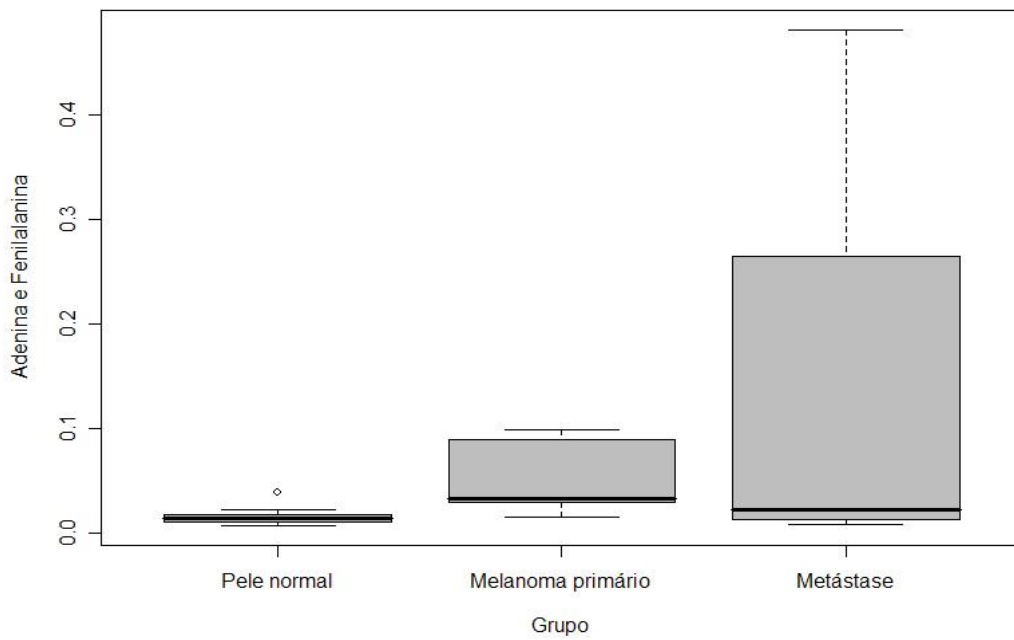


Figura 36 - Distribuição da variável Adenina e Fenilalanina em cada grupo estudado.

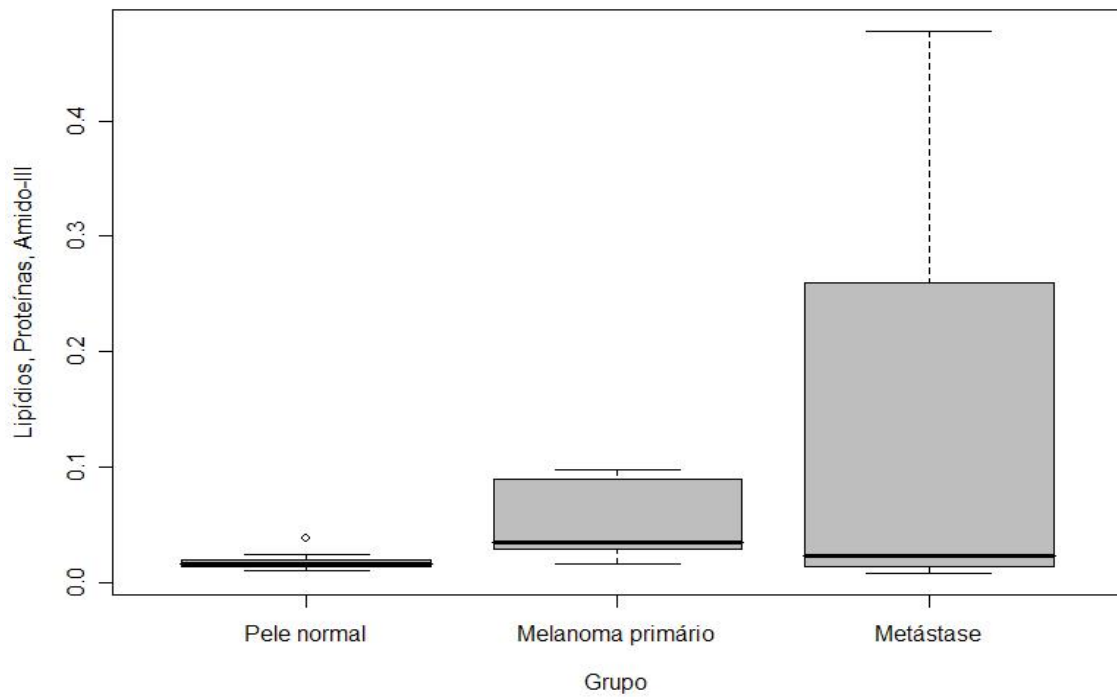


Figura 37 - Distribuição da variável Lipídios, Proteínas, Amido III em cada grupo estudado.

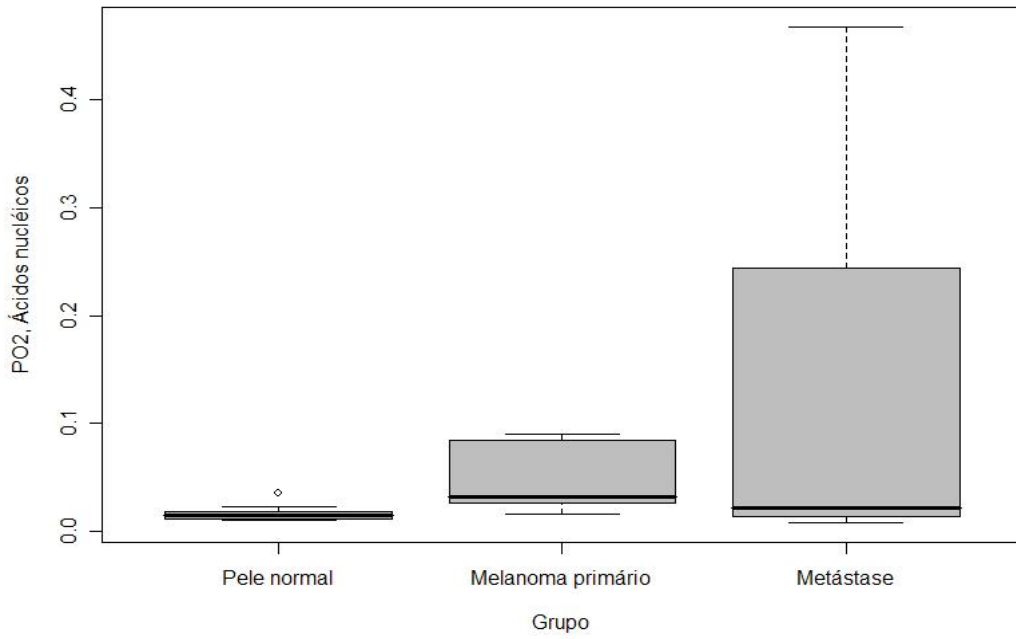


Figura 38 - Distribuição da variável PO_2 , Ácidos nucleicos em cada grupo estudado.

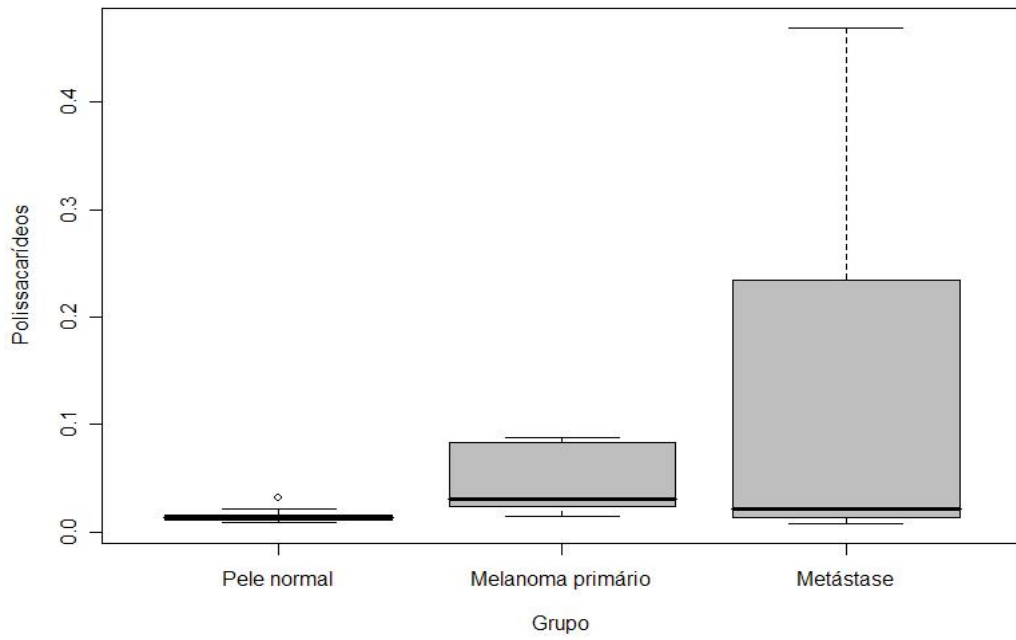


Figura 39 - Distribuição da variável Polissacarídeos em cada grupo estudado.

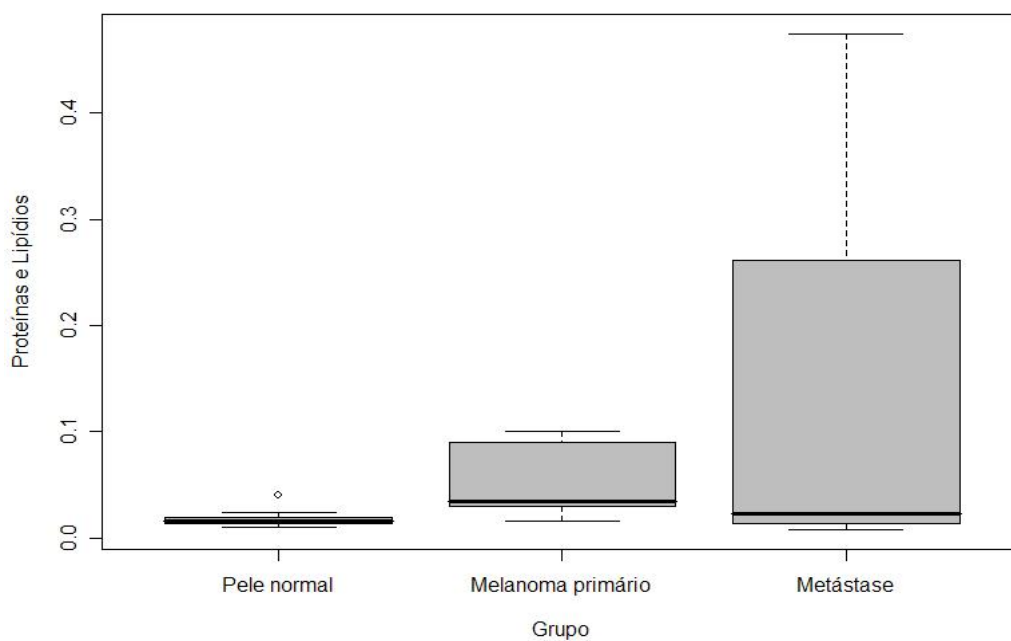


Figura 40 - Distribuição da variável Proteínas e Lipídios em cada grupo estudado.

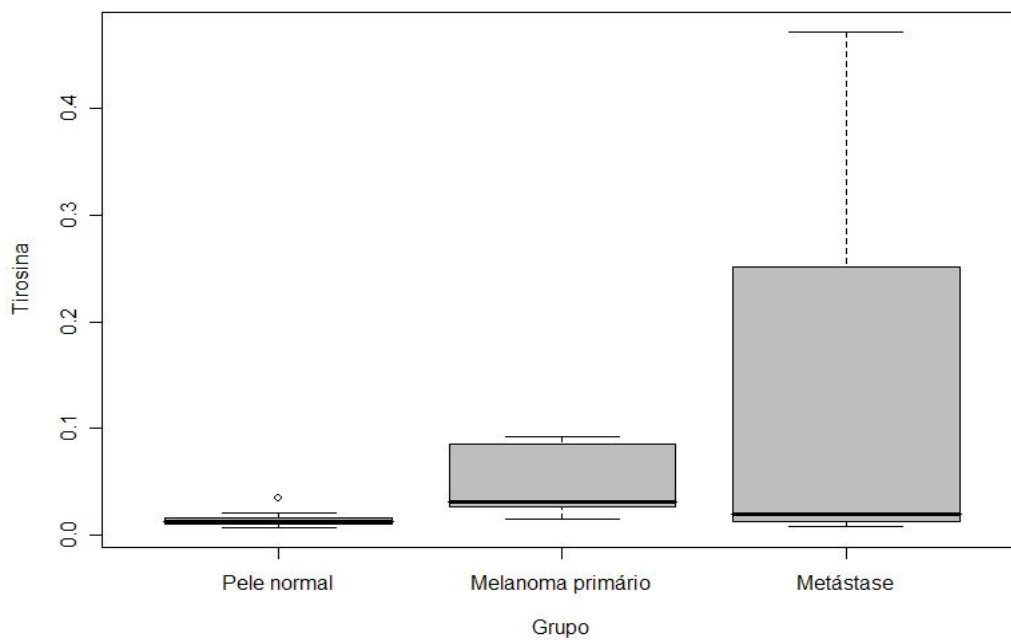


Figura 41- Distribuição da variável Tirosina em cada grupo estudado.

ANEXO

1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 17 de fevereiro de 2006.
CEP 1642/05

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA
Co-Investigadores: Ivan Dunshee de A O Santos (orientador), Ayrton Abrão Martin, Heitor Carvalho Gomes
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Espectroscopia FT-raman no diagnóstico do melanoma primário e metastático".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: sem risco, desconforto mínimo, sem procedimento invasivo.

OBJETIVOS: obter espectros FT- Raman de melanoma cutâneo primário e metastático e qualificar os dados espectrais.

RESUMO: Vinte lesões serão escolhidas aleatoriamente, sendo 10 fragmentos de lesões primárias e 10 de tumores metastáticos, de pacientes operados pelo grupo de Tumores Cutâneos da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. As amostras serão congeladas em nitrogênio líquido, logo em seguida à remoção do melanoma, e transportadas para o laboratório de Física da Universidade do Vale do Paraíba para a realização do experimento. Após descongelamento, um fragmento é retirado, colocado em um espelho que é colocado no espectômetro FT-Raman para análise qualitativa molecular do melanoma. Após a leitura das amostras, elas são armazenadas no nitrogênio e depois são submetidas a exame histopatológico para confirmação do diagnóstico..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, visando avaliar a técnica de espectroscopia FT-Raman em melanoma primário e metastático.

MATERIAL E MÉTODO: Descreve os procedimentos, utilizando fragmentos de material de cirurgia.

TCLE: Adequado, de acordo com a resolução 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo - R\$ 400,00.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 12/2/2007 e 7/2/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Este é um convite para participação voluntária de um estudo que tem por objetivo comparar a estrutura molecular do melanoma primário e metastático através da Espectroscopia FT-Raman, esta técnica permite a realização de diagnóstico de diferentes tecidos através do uso de laser e poderá possibilitar um diagnóstico precoce e preciso do melanoma. O paciente será submetido à retirada da lesão primária e/ou metastática. Após cirurgia, o material retirado, como habitualmente é feito, será submetido a exame anatomopatológico. Um fragmento será armazenado e congelado em nitrogênio líquido para, posterior análise no espectrômetro. As amostras serão descongeladas no laboratório. No espectromêtro as amostras são analisadas durante 10 minutos, tempo suficiente para prevenir degradação das mesmas.

O risco para o paciente em relação ao estudo é mínimo, visto que o material usado será removido de qualquer forma na cirurgia. A contribuição do estudo visa agilizar e tornar mais preciso o diagnóstico, pois apesar das inúmeras pesquisas a remoção precoce da lesão ainda é a principal forma de tratamento efetivo do melanoma. Dessa forma, o desenvolvimento desse método pode favorecer no futuro pacientes com a mesma doença. Não existem procedimentos alternativos em relação à pesquisa porque o material é colhido de pacientes que aceitaram a cirurgia como forma de tratamento e o fragmento é colhido logo após a remoção da peça cirúrgica. Em qualquer etapa do estudo, o paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O pesquisador principal é Dra. Andréa Fernandes de Oliveira, que pode ser encontrada no seguinte endereço: Rua Napoleão de Barros, 715 - 4º andar - Vila Clementino - São Paulo - CEP: 04024-002 – Fone: (11)5576-4118 – Fax: (11)5571-6579 – Celular: (11)8383-7877 – e-mail: drandreafernandes@terra.com.br. Se o paciente tiver

alguma dúvida sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj. 14 – Fone: (11)5571-1062 ou Fax: (11) 5539-7162 – e-mail: cepunifesp@epm.br. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento pela Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, e não serão divulgadas as identificações dos pacientes. O paciente possui o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação.

Eu, _____
_____, RG _____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Espectroscopia Raman no Diagnóstico do Melanoma Cutâneo Primário e Metastático”.

Eu discuti com a Dra. Andrea Fernandes de Oliveira, sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do paciente ou representante legal

_____ Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do pesquisador principal

3 - O que é a espectroscopia Raman ?

Histórico

Chandrasekhara Venkata Raman, descobridor do efeito Raman, nasceu em 7 de novembro de 1888, em Madras, na Índia e faleceu em 21 de novembro de 1970. A partir de 1917, tornou-se professor da Universidade de Cálcuta e na sua primeira viagem para fora da Índia, para Oxford em 1921, ele realizou alguns experimentos e publicou uma nota na revista *Nature* intitulada, “the color of the sea”, onde dele defendeu que a cor do oceano é independente da reflexão ou absorção da cor do céu, e existe devido ao espalhamento da luz na água. Assim começou a sua pesquisa sobre o espalhamento da luz, trabalho que levou ao descobrimento do efeito Raman em 1928, e após dois anos recebeu o prêmio Nobel de Física pela sua descoberta. Ele foi o primeiro asiático, e o único indiano a receber esse prêmio (HANLON et al, 2000).

A espectroscopia Raman somente foi utilizada como uma ferramenta analítica após a invenção da luz “*laser*”. A introdução do uso da radiação “*laser*” como fonte de excitação na Espectroscopia Raman, em 1962, se deve ao brasileiro Sérgio Porto, que em colaboração com Wood, utilizaram “*laser*” pulsado de rubi para obtenção de espectros Raman. Em 1963, Kogelnik e Porto foram os primeiros a utilizar luz *laser* de Hélio-Neônio (He-Ne) na Espectroscopia Raman (CARTER, 2004).

A espectroscopia Raman começou a ser utilizada primeiramente nos laboratórios de pesquisa para a caracterização de materiais inorgânicos (gasosos, líquidos ou sólidos), e na década de 80, com a introdução do uso do efeito Raman no infravermelho próximo associado ao uso da transformada de Fourier e o acoplamento

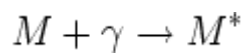
do espectrômetro aos sistemas de aquisição de dados em computadores ocorreu um impulso nas investigações em materiais biológicos²¹ (NUNES et al, 2003).

A Transformada de Fourier foi desenvolvida por Jean Baptiste Joseph Fourier em 1822, um matemático francês, se tornou uma ferramenta matemática de grande aplicabilidade na solução dos problemas de processamento digital de imagens, ou seja, pode ser utilizada para análise ou reconstrução bi-dimensional de imagens em geral, por sua facilidade e rapidez de cálculo (CARTER, 2004).

Atualmente, a espectroscopia Raman vem sendo utilizada extensivamente na área biomédica para estudar as estruturas e as vibrações moleculares importantes no diagnóstico e no estudo das neoplasias no homem (STONE et al., 2002).

Princípios da Espectroscopia Raman

Uma molécula típica, M , possui vários níveis de energia diferentes. Quando uma molécula absorve um fóton, sua energia aumenta em uma quantidade igual a da energia do fóton. A molécula então entra em um estado excitado, M^* . Então, teremos a fórmula:



São três os principais tipos de processo pelos quais a radiação interage com a amostra e é analisada:

- Espectroscopia de absorção - Correlaciona a quantidade da energia absorvida em função do comprimento de onda da radiação incidente.
- Espectroscopia de emissão - Analisa a quantidade de energia emitida por uma amostra contra o comprimento de onda da radiação absorvida. Consiste fundamentalmente na reemissão de energia previamente absorvida pela amostra
- Espectroscopia de espalhamento (ou de dispersão)- Determina a quantidade da energia espalhada (dispersa) em função de parâmetros tais como o comprimento de onda, ângulo de incidência e o ângulo de polarização da radiação incidente.

A Espectroscopia Raman pode ser classificada baseada por sua fonte de luz utilizada, como por exemplo: Ultra-Violeta (UV), Visível e Infra-Vermelho (IR). Para a maioria das aplicações da Espectroscopia Raman nos materiais biológicos, fontes de excitação no infravermelho são mais utilizadas devido à propriedade física de conseguir diminuir virtualmente a emissão de autofluorescência de, por exemplo, enzimas presentes nos tecidos biológicos. Os *lasers* mais comuns usados pela Espectroscopia Raman no infravermelho são: Neodímio Ítrio-Alumínio-Granada (Nd: YAG) e Titânio-Safira (Ti: Safira) (SALA, 1999).

Sinais Raman obtidos a partir de amostras biológicas são extremamente fracos, e a emissão de fluorescência quando a luz atinge um tecido pode ser um milhão de vezes maior do que o espalhamento Raman. No Raman convencional onde para excitação geralmente se utilizam *lasers* de radiação visível, cerca de 90% das amostras que contém impurezas produzem forte fluorescência, mascarando assim, o sinal Raman. No entanto, se o comprimento de onda excitante for maior que 700 nm, utilizando infravermelho próximo esta interferência não acontece. A melhor opção para esta situação é a Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-

Raman) utilizando como fonte de excitação o laser de Nd: YAG no comprimento de onda de 1064 nm (HANLON et al, 2000).

A excitação no infravermelho próximo, a 1064 nm, também minimiza a degradação fotolítica da amostra, permitindo que uma maior potência de incidência do *laser* seja utilizada para compensar o espalhamento Raman menos intenso quando excitado por comprimentos de onda mais longos. Há alguns anos, foi demonstrado que quando se emprega um laser de Nd: YAG como fonte de excitação para o efeito Raman, o número de amostras que fluorescem diminui enormemente (CARTER, 2004).

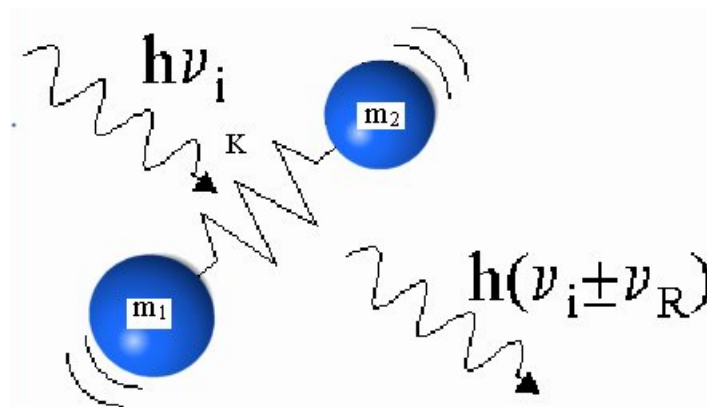


Figura 42 - Descrição esquemática do Efeito Raman. $h\nu_i$: energia da luz incidente; $h\nu_R$: energia da luz espalhada.

Espalhamento Raman

Os espectrômetros são equipamentos destinados à análise de radiação, isto é, ondas eletromagnéticas (incluindo-se nestas a luz visível). Desta forma, servem para a análise físico-química cujo processo é chamado espectroscopia. Os espectrômetros compreendem uma fonte de energia radiante, um sistema colimador (fenda, lentes...), um local destinado à amostra, um sistema monocromador e um sistema detector. Todo equipamento está conectado a um computador, que possui programas para ajudar a interpretar os sinais Raman (figura 46) (CHOO-SMITH et al).

O efeito Raman é um processo no qual a energia entre luz e matéria é trocada. Quando a luz atinge uma substância ela pode ser absorvida ou espalhada. A maior parte da luz espalhada apresenta a mesma frequência da luz incidente. Entretanto, uma pequena fração da luz incidente pode causar vibrações nas moléculas do material. A energia deve ser proveniente da luz incidente. Como a energia da luz é proporcional à frequência, a mudança de frequência desta luz espalhada deve ser igual a frequência da vibração das moléculas espalhadas. Este processo de troca de energia entre moléculas e luz incidente é conhecido como efeito Raman (HANLON et al, 2000).

O processo de dispersão Raman pode ser visto como a transição de uma molécula do seu estado estático para um estado vibracional excitado, acompanhado pela absorção simultânea de um fóton incidente e emissão de um fóton espalhado. A dispersão Raman em comprimentos de onda de diferentes excitações (UV, IR, visível) produzem a mesma mudança na energia de vibração, conseqüentemente o comprimento de onda excitado pode ser escolhido. A luz espalhada pode ser coletada por um espectrômetro e mostrada como um espectro. Como cada molécula tem seu

próprio conjunto de vibrações moleculares, o espectro Raman de um material em particular consiste de uma série de picos ou bandas (HANLON et al, 2000).

Na espectroscopia Raman a estrutura molecular e a composição do material sob estudo é codificado como um conjunto de mudanças de frequência da luz espalhada. Assim, o espectro Raman pode fornecer uma impressão digital de uma substância a partir do qual a sua composição molecular pode ser determinada. Os espectros Raman de tecidos são compostos de bandas relativamente estreitas, tipicamente $10 - 20 \text{ cm}^{-1}$ na largura, o que demonstra a presença de várias moléculas diferentes. A contribuição relativa dessas moléculas para o espectro Raman do tecido é proporcional à sua quantidade no tecido (HANLON et al, 2000).

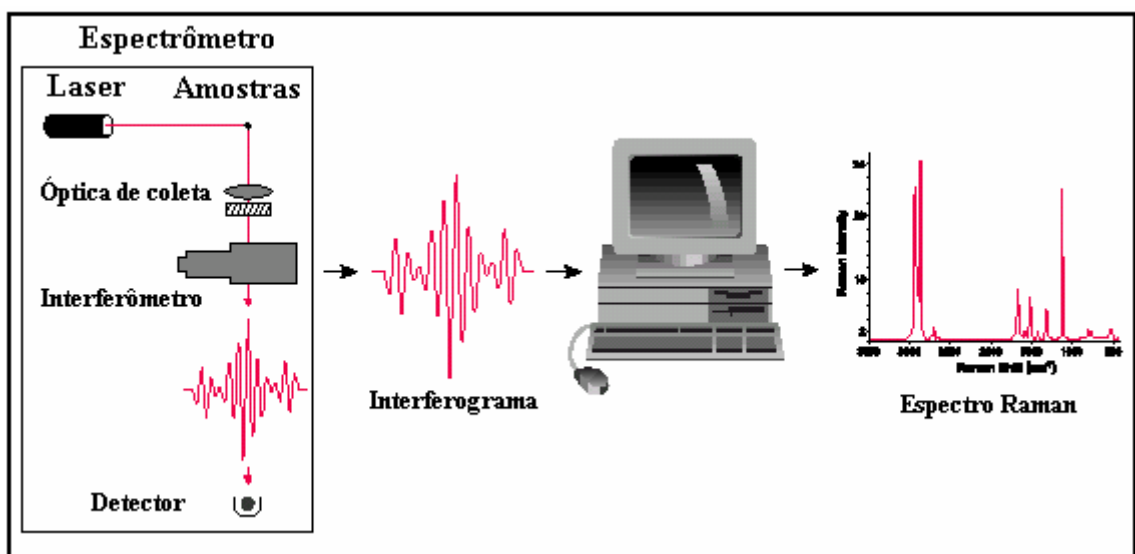


Figura 43 - Sistema de espectroscopia FT-Raman